

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Física I**



**TESIS DOCTORAL**

**Lipofección del DNA con nanovectores coloidales de interés en  
terapia génica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Mónica Muñoz Úbeda**

**Directores**

**Elena Junquera González,  
Emilio Aicart Sospedra**

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Química Física I**



***LIPOFECCIÓN DEL DNA CON  
NANOVECTORES COLOIDALES DE  
INTERÉS EN TERAPIA GÉNICA***

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias, por:

***Mónica Muñoz Úbeda***

**Directores**

***Elena Junquera González***

Profesora Titular de la  
Universidad Complutense de Madrid

***Emilio Aicart Sospedra***

Catedrático de la  
Universidad Complutense de Madrid

**Madrid 2013**



*Para los pilares que sostienen mi vida.*

*Mis padres Maximiliano y Angélica,  
mis hermanos Laura, Félix, Regina, Ángel y Álvaro  
y en especial a mi marido Jorge.*





# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Agradecimientos</i>   | <i>1</i>  |
| <i>Glosario de acrónimos</i>                                   | <i>5</i>  |
| <i>Glosario de símbolos</i>                                    | <i>9</i>  |
| <b>RESUMEN</b>   | <b>15</b> |
| <b>1. TERAPIA GÉNICA: ANTECEDENTES Y ACTUALIDAD</b>            | <b>19</b> |
| <b>1.1. TERAPIA GÉNICA</b>                                     | <b>21</b> |
| 1.1.1. Precedentes históricos                                  | 21        |
| 1.1.2. Bases actuales  | 23        |
| 1.1.3. Transfección  | 26        |
| <b>1.2. EL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO</b>                       | <b>32</b> |
| 1.2.1. Características estructurales                           | 32        |
| 1.2.2. Características biofísicas y bioquímicas                | 37        |
| <b>1.3. VECTORIZACIÓN COLOIDAL DEL DNA: LIPOPLEJOS</b>         | <b>39</b> |
| 1.3.1. Vesículas y liposomas                                   | 40        |
| 1.3.2. Lipoplejos  | 46        |
| <b>1.4. BIBLIOGRAFÍA</b>                                       | <b>54</b> |
| <b>2. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA Y BIOQUÍMICA DE LIPOPLEJOS</b> | <b>59</b> |
| <b>2.1. SISTEMAS Y MATERIALES</b>                              | <b>61</b> |
| 2.1.1. Lípidos catiónicos ( $L^+$ )                            | 61        |
| 2.1.2. Lípido zwitteriónico ( $L^0$ )                          | 62        |
| 2.1.3. Ácido desoxirribonucleico (DNA)                         | 63        |
| 2.1.4. Sondas fluorescentes                                    | 64        |
| 2.1.5. Otros materiales  | 65        |
| 2.1.6. Sistemas estudiados: lipoplejos                         | 65        |
| <b>2.2. PREPARACIÓN DE LOS LIPOSOMAS Y LIPOPLEJOS</b>          | <b>66</b> |
| 2.2.1. Preparación de las películas lipídicas                  | 66        |
| 2.2.2. Hidratación, reducción y homogeneización                | 67        |
| <b>2.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b>                            | <b>69</b> |
| 2.3.1. Movilidad electroforética y potencial zeta              | 69        |
| 2.3.2. Electroforesis en gel de agarosa                        | 71        |
| 2.3.3. Espectroscopia de fluorescencia                         | 74        |
| i. Intercalación de sondas fluorescentes en la hélice de DNA   | 75        |
| ii. Anisotropía de fluorescencia                               | 76        |
| 2.3.4. Crio-Microscopía Electrónica de Transmisión (crio-TEM)  | 80        |

|   |     |
|---|-----|
| 2.3.5. Microscopía Confocal de fluorescencia                                | 83  |
| 2.3.6. Dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS)                           | 87  |
| 2.3.7. Flow assisted cell sorting o Citometría de Flujo (FACS)              | 90  |
| 2.3.8. Medida de la Citotoxicidad (ensayo MTT)                              | 93  |
| <b>2.4. MODELOS TEÓRICOS</b>  | 96  |
| 2.4.1. Modelo teórico de agregación-desagregación                           | 96  |
| 2.4.1.1. Renormalización de cargas  | 103 |
| <b>2.5. BIBLIOGRAFÍA</b>  | 105 |
| <b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | 109 |
| <b>3.1. LIPOPLEJOS CON LÍPIDOS CATIÓNICOS DE UNA CABEZA POLAR</b>           | 111 |
| 3.1.1. Resultados y publicaciones   | 111 |
| 3.1.2. Discusión  | 139 |
| 3.1.3. Bibliografía   | 156 |
| <b>3.2. LIPOPLEJOS CON LÍPIDOS CATIÓNICOS GEMINI DE DOS CABEZAS POLARES</b> | 157 |
| 3.2.1. Resultados y publicaciones   | 157 |
| 3.2.2. Discusión  | 214 |
| 3.2.3. Bibliografía   | 229 |
| <b>4. ASPECTOS MÁS RELEVANTES Y CONCLUSIONES</b>                            | 231 |
| <b>5. ANEXO</b>   | 239 |
| 1. Síntesis de los liposomas catiónicos gemini                              | 239 |
| 2. Síntesis del plásmido circular pEGFP-C3                                  | 239 |
| 3. Metodología experimental   | 240 |
| • Potencial zeta  | 240 |
| • Electroforesis en gel de agarosa  | 241 |
| • Espectroscopía de fluorescencia   | 242 |
| i. Experimentos de intercalación de EtBr                                    | 242 |
| ii. Anisotropía de fluorescencia con DPH                                    | 243 |
| • Crio- Microscopía Electrónica de Transmisión (crio-TEM)                   | 244 |
| • Microscopía Confocal de fluorescencia                                     | 246 |
| • Dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS)                                | 246 |
| • Flow Assisted Cell Sorting o Citometría de Flujo (FACS)                   | 247 |
| • Viabilidad Celular/Citotoxicidad (Ensayo MTT)                             | 249 |
| 4. Bibliografía   | 251 |

## AGRADECIMIENTOS

Llegando al final de esta gratificante y provechosa etapa de formación y a punto de continuar mi carrera investigadora, debo agradecer la ayuda, colaboración, paciencia y amistad de muchas personas que han ido apareciendo en mi vida a lo largo de la realización de esta Tesis y que sin ellos no se habría hecho realidad.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis: la Dra. Elena Junquera, Profesora Titular de Universidad, y el Dr. Emilio Aicart, Catedrático de Universidad, por haber puesto su confianza en mí, por su gran apoyo y paciencia y por todos los conocimientos que me han aportado. También quiero darles las gracias por haberme ayudado a afianzar mis estudios y por hacer que la ilusión que tengo por la investigación sea cada vez mayor.

También quisiera agradecer al Departamento de Química Física I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid que me haya permitido desarrollar los estudios de Doctorado y me haya proporcionado toda la ayuda y facilidades necesarias para llevar a cabo mi investigación. También le agradezco al Ministerio de Educación la concesión de un contrato de investigador adscrito a los proyectos del MEC, FIS2008-06197-C02-01 y CTQ2009-10002BQU, que me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral.

También debo agradecer al Prof. Santanu Bhattacharya del Departamento de Química Orgánica del Indian Institute of Science (IISc) de Bangalore (India), el haberme permitido colaborar con ellos y realizar en su laboratorio la parte de estudios biológicos que se encuentran recogidos en esta Tesis. También agradezco a todos los que componen su grupo de investigación, a Joydeep, Santosh, Mohini, Sougata, Krishan, Guru, Asfa, Basu, Bappa, Parikshit, Subham, Namita, Ananya, Akash, Sunam y Nilanyan, su gran hospitalidad durante mis estancias en los años 2010 y 2011, su ayuda, paciencia y todos los conocimientos aportados acerca de las técnicas, protocolos de preparación de los cultivos celulares y de las muestras, y su posterior análisis de datos, así como el tiempo dedicado a la síntesis de todos los liposomas catiónicos gemini que componen el estudio bioquímico de mi Tesis.

Agradecimiento especial merecen también todos los investigadores que me han ayudado a completar varios apartados de esta Tesis. En primer lugar, el Dr. Óscar Llorca, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), y el Dr. Pablo Castro, del Servei de Microscòpia de la Facultat de Ciències de Bellaterra (Barcelona), por su especial ayuda y aportación en la realización y tratamiento de las imágenes de criomicroscopía electrónica de transmisión. También quiero agradecer a la Dra. Aurora Nogales, del Instituto de Estructura

de la Materia (CSIC), y a François Fauth del European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) del beamline 16, por las facilidades brindadas en la realización de las medidas de dispersión de rayos X a bajo ángulo, SAXS, así como por sus explicaciones referentes al manejo de esta técnica e interpretación de los resultados. Asimismo, merecen un agradecimiento especial los Drs. Alberto Martín Molina y Manuel Quesada Pérez, del Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada, por sus interesantes aportaciones teóricas a esta Memoria. También, mi más afectuoso agradecimiento a la Lda. Clara Aicart, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la UCM, por el excelente trabajo de amplificación y purificación del plásmido pEGFP-C3 DNA, así como por el estudio de electroforesis en gel de agarosa y sus detalladas explicaciones bioquímicas.

Quiero mencionar muy especialmente a mis compañeros y amigos del grupo, el Dr. Alberto Rodríguez Pulido y la Lda. Ana Lilia Barrán Berdón, por el tiempo que me han dedicado, por lo que han compartido conmigo durante estos años, por los conocimientos que me han aportado, por su ayuda, apoyo, paciencia, por sus críticas constructivas, por sus buenas recomendaciones y por los buenos momentos que hemos pasado no sólo en el laboratorio, sino también fuera de él.

Otra mención especial va dirigida a todos mis compañeros del Departamento con los que he vivido muy buenos momentos, tanto en los descansos para desayunar y comer en la universidad como fuera de ella, y con los que me he desahogado en los momentos tristes, en definitiva, todos los que me han alegrado mi día a día: Lara, Silvia, Elisa, Mike, María José (MJ), Jacobo, Yoli, Mac, María (Cueva), Lufi, Marta Enciso, María Larriva, Ramiro, Jorge, Sara, Marta Ruano, Alma, Nubia, Hezi, Beatriz, Nuria, Richard, Diego y Pablo. También quiero recordar a mi amiga Belén, de Bahía Blanca, con la que pude compartir bonitos momentos en el laboratorio y en el viaje a Grenoble para hacer las medidas de dispersión de Rayos X. ¿Cómo me iba a olvidar de todos vosotros?

También deseo dar las gracias a todos mis amigos y familiares por su paciencia, apoyo, su cercanía, preocupación, su atención y sus ánimos para que continuara y diera el máximo de mí. Y por último, quisiera agradecer a mis padres Maximiliano y Angélica, a mis hermanos Laura, Félix, Regina, Ángel y Álvaro, y a mi marido Jorge, latir de mi corazón, por su incondicional apoyo, comprensión, paciencia, dedicación, su cariño y sus ánimos para que afrontara todo sin miedos y sin cansancio. Papá, esta Tesis va dedicada especialmente a ti, ya que tú fuiste el primero que confió en mí, tú me animaste a hacer la Tesis, siempre estabas

muy atento a todo lo que te contaba y me ayudabas con tus sabios consejos, siempre hablabas orgulloso de mí, y eso te lo agradeceré enormemente el resto de mi vida.

Quiero agradecer, de todo corazón, a muchas de las personas mencionadas anteriormente su compañía, amabilidad y calidez tanto el día 5 de Mayo del 2012 en mi matrimonio, como el día 3 de Septiembre del 2012 en el fallecimiento de mi padre tras una larga lucha contra el cáncer. Este apoyo y ánimo han sido muy importantes para mí.



## GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

|                      |   |
|----------------------|---|
| <i>A</i>             | adenina   |
| <i>A<sup>+</sup></i> | grupo catiónico amonio  |
| <i>ADA</i>           | adenosina desaminasa  |
| <i>A-DNA</i>         | estructura secundaria de DNA con baja humedad para ser hidratada (11 bp)  |
| <i>AFM</i>           | microscopía electrónica de fuerza atómica                                 |
| <i>ATP</i>           | adenosina trifosfato  |
| <i>bcc</i>           | estructura cúbica centrada en el cuerpo                                   |
| <i>B-DNA</i>         | estructura secundaria de DNA enrollada hacia la derecha (10 bp)           |
| <i>bp</i>            | pares de bases de DNA   |
| <i>C</i>             | citosa  |
| <i>CCD</i>           | cámara de detección de luz (charge-coupled device)                        |
| <i>CFM</i>           | microscopía confocal de fluorescencia                                     |
| <i>CHO</i>           | Chinese hamster ovary cells   |
| <i>CLs</i>           | lípidos catiónicos  |
| <i>COS7</i>          | african green monkey fibroblast cells SV40                                |
| <i>Crio-TEM</i>      | crio-microscopía electrónica de transmisión                               |
| <i>ctDNA</i>         | calf thymus DNA   |
| <i>DNA</i>           | ácido desoxirribonucleico   |
| <i>DNAse</i>         | enzimas que destruyen el DNA  |
| <i>DC-Chol</i>       | cloruro de 3- $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]-colesterol |
| <i>DLPC</i>          | 1,2-dilauroil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina                           |
| <i>DLS</i>           | dispersión de luz dinámica  |
| <i>DLVO</i>          | teoría de Derjaguin Landau Verwey Overbeek                                |
| <i>DMEM</i>          | Dubelco's Modified Eagle Medium   |
| <i>DMSO</i>          | dimetilsulfóxido  |
| <i>DODAB</i>         | bromuro de dioctadecil-dimetilamonio                                      |
| <i>DOEPC</i>         | cloruro de 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-etilfosfocolina             |
| <i>DOPC</i>          | 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina                       |
| <i>DOPE</i>          | 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina                       |
| <i>DPBS</i>          | Dubelco's Phosphate Buffered Saline                                       |
| <i>DPH</i>           | 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno  |
| <i>DSC</i>           | calorimetría diferencial de barrido                                       |
| <i>DSTAP</i>         | cloruro de 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio propano                       |
| <i>EDTA</i>          | ácido etilendiaminatetraacético   |



|                        |   |
|------------------------|---|
| <i>ELISA</i>           | modelo de lector de placa   |
| <i>EMAN</i>            | programa informático de análisis de micrografía electrónica   |
| <i>EtBr</i>            | bromuro de etidio   |
| <i>FACS</i>            | Flow Assisted Cell Sorting  |
| <i>FBS</i>             | Fetal Bovine Serum  |
| <i>fcc</i>             | estructura cúbica centrada en las caras   |
| <i>Forma I DNA</i>     | plásmido de DNA circular superenrollado   |
| <i>Forma II DNA</i>    | plásmido de DNA circular relajado (sin superenrollamiento de la hélice)                                       |
| <i>FSC</i>             | Forward Scatter detector  |
| <i>FTIR</i>            | Fourier transform infrared spectroscopy   |
| <i>G</i>               | guanina   |
| <i>GEMCLs</i>          | lípidos catiónicos gémini   |
| <i>GFP</i>             | Green Fluorescence Protein  |
| <i>GUV</i>             | vesículas unilamelares gigantes   |
| $H_{II}^C$             | fase hexagonal inversa  |
| <i>H460</i>            | células con expresión de DUSP1 en progresión tumoral y en respuesta a CDDP en cáncer no microcítico de pulmón |
| <i>HEK293T</i>         | Human Embryon Kidney cells línea 293 T, para la producción de retrovirus                                      |
| <i>HeLa</i>            | células de cáncer cervical con el cromosoma modal nº 82   |
| <i>HEPES</i>           | disolución reguladora HEPES-H + HEPES-Na 40 mM y pH = 7,4   |
| <i>HEPES-H</i>         | ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacina-1-etanosulfónico   |
| <i>HEPES-Na</i>        | 4-(2-hidroxietil)-piperacina-1-etanosulfonato sódico  |
| <i>HGP</i>             | Proyecto Genoma Humano  |
| <i>HI</i>              | tipo específico de histonas   |
| <i>HLA-B7</i>          | gen específico del DNA  |
| <i>H-NMR</i>           | Resonancia magnética nuclear de protón  |
| <i>Ia3d</i>            | fase cúbica de doble giro   |
| <i>IC<sub>50</sub></i> | Inhibición del crecimiento en un 50 %   |
| <i>ITC</i>             | calorimetría isoterma de valoración   |
| $L_{\alpha}$           | fase lamelar  |
| <i>LB</i>              | Luria Broth   |
| <i>LDE</i>             | electroforesis láser Doppler  |
| <i>LDL</i>             | lipoproteína de baja densidad   |
| <i>Lipoplejo</i>       | complejo liposoma mixto-DNA   |
| <i>LUV</i>             | vesículas unilamelares grandes  |
| <i>Magnetoplejo</i>    | complejo nanopartícula magnética-DNA  |
| <i>MCS</i>             | clonado múltiple  |

---

|                      |   |
|----------------------|---|
| <i>META</i>          | detector policromático  |
| <i>MFI</i>           | mean fluorescence intensity   |
| <i>MLV</i>           | vesículas multilamelares  |
| <i>MOG</i>           | derivados del monoolein glicerol  |
| <i>MNPs</i>          | nanopartículas magnéticas   |
| <i>MNP-DNA</i>       | magnetoplejo  |
| <i>MTT</i>           | bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol                 |
| <i>PB</i>            | Poisson-Boltzmann   |
| <i>PBS</i>           | Phosphate Buffered Saline   |
| <i>pDNA</i>          | plásmido DNA  |
| <i>pEGFP-C3</i>      | plásmido DNA circular marcado con GFP                                     |
| <i>penstrep</i>      | penicilina y estreptomicina   |
| <i>PI</i>            | Propidium Iodide  |
| <i>PILATUS</i>       | detector de Rayos X   |
| <i>PMT</i>           | fotomultiplicador   |
| <i>RNA</i>           | ácido ribonucleico  |
| <i>SAXS</i>          | small angle X-ray scattering  |
| <i>scc</i>           | estructura cúbica centrada en los lados                                   |
| <i>SEM</i>           | microscopía electrónica de barrido  |
| <i>SLC</i>           | cristal fuertemente correlacionado  |
| <i>SSC</i>           | side scatter detector   |
| <i>STM</i>           | microscopía electrónica de efecto túnel                                   |
| <i>Surfoplejo</i>    | complejo micela-DNA   |
| <i>SUV</i>           | vesículas unilamelares pequeñas   |
| <i>T</i>             | timina  |
| <i>1x TAE</i>        | buffer compuesto de Tris-HCl, acetato y EDTA (pH = 8,2)                   |
| <i>TEM</i>           | microscopía electrónica de transmisión                                    |
| <i>UV-VIS</i>        | ultravioleta-visible  |
| <i>U343</i>          | células del glioma clonal humano  |
| <i>V<sub>I</sub></i> | fase cúbica   |
| <i>Z-DNA</i>         | estructura secundaria de DNA enrollada a la izquierda (12 pares de bases) |



## GLOSARIO DE SÍMBOLOS

|                     |  |
|---------------------|--|
| $A$                 | área   |
| $A_\lambda$         | absorbancia  |
| $a$                 | radio de la partícula/liposoma   |
| $a_0$               | área efectiva que ocupa la cabeza polar de un tensioactivo en la superficie del agregado |
| $\alpha$            | fracción molar de lípido catiónico en el liposoma mixto (en moles)                       |
| $B$                 | línea base   |
| $bp$                | par de bases de DNA  |
| $C$                 | capacitancia   |
| $cac$               | concentración de agregación crítica  |
| $C_{C, free}$       | concentración de complejos libres liposoma-DNA en disolución                             |
| $CR$                | relación de cargas del lipoplejo   |
| $(CR)_\phi$         | relación de cargas del lipoplejo en la electroneutralidad ( $= 1$ )                      |
| $\rho_{eff}$        | relación de cargas efectiva del lipoplejo  |
| $(\rho_{eff})_\phi$ | relación de cargas efectiva del lipoplejo en la electroneutralidad ( $= 1$ )             |
| $\rho_{est}$        | relación de cargas estimada del lipoplejo  |
| $cmc$               | concentración micelar crítica  |
| $cvc$               | concentración vesicular crítica  |
| $D$                 | masa de DNA  |
| $[D]$               | concentración de DNA   |
| $DA$                | diámetro de abertura   |
| $DT$                | diámetro de tubo   |
| $d$                 | distancia de espaciado   |
| $d_{ctDNA}$         | distancia entre dos DNA lineales consecutivos en la monocapa lipídica                    |
| $d_{pDNA}$          | distancia entre dos plásmidos DNA consecutivos en la monocapa lipídica                   |
| $d_m$               | espesor de la bicapa lipídica  |
| $d_w$               | espesor de la capa acuosa donde debe incorporarse el DNA                                 |
| $E(N)$              | energía de correlación liposoma-DNA  |
| $E_0$               | energía de unión por complejo en un <i>cluster</i>                                       |
| $E_e$               | campo eléctrico aplicado   |
| $[EtBr]$            | concentración de Bromuro de etidio   |

---

|                 |  |
|-----------------|--|
| $e$             | carga del electrón ( $= 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$ )   |
| $eo$            | espesor óptico   |
| $F(N, x)$       | energía libre del sistema  |
| $F_a(N, x)$     | energía libre de un “cluster” de complejos   |
| $F_c(N, x)$     | energía libre de los complejos formados por 1 liposoma y $N$ cadenas de DNA                                    |
| $F_p(N, x)$     | energía libre de las moléculas de DNA libres en disolución   |
| $f$             | coeficiente de fricción  |
| $f(N)$          | energía libre de 1 complejo, formado por 1 liposoma y $N$ cadenas de DNA                                       |
| $f(\kappa_D a)$ | función de Henry   |
| $G$             | factor $G$   |
| $I$             | intensidad de fluorescencia  |
| $I_0$           | intensidad de fluorescencia inicial  |
| $I_1$           | intensidad de fluorescencia del primer máximo de emisión   |
| $I_{HH}$        | intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada horizontalmente en la excitación y en la emisión               |
| $I_{HV}$        | intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada horizontalmente en la excitación y verticalmente en la emisión |
| $I_{VH}$        | intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada verticalmente en la excitación y horizontalmente en la emisión |
| $I_{VV}$        | intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada verticalmente en la excitación y en la emisión                 |
| $I_{\parallel}$ | intensidad de luz de emisión (de fluorescencia) con los polarizadores de excitación y emisión paralelos        |
| $I_{\perp}$     | intensidad de luz de emisión (de fluorescencia) con los polarizadores de excitación y emisión perpendiculares  |
| $I_{\max}$      | intensidad máxima de luz dispersada  |
| $K$             | factor proporcional  |
| $K_s$           | constante de asociación del complejo ( $F \cdot Q$ )   |
| $k$             | constante de Boltzmann ( $= 1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ )  |
| $L$             | masa de lípido total   |
| $[L]$           | concentración de lípido total  |
| $L^+$           | masa de lípido catiónico   |

|                    |  |
|--------------------|--|
| $[L^+]$            | concentración de lípido catiónico  |
| $L^0$              | masa de lípido zwitteriónico   |
| $[L^0]$            | concentración de lípido zwitteriónico  |
| $L/D$              | relación de masas lípido/DNA   |
| $(L/D)_\phi$       | relación de masas lípido/DNA en la electroneutralidad  |
| $(L/D)_{\phi,teo}$ | relación de masas lípido/DNA en la electroneutralidad teórica  |
| $(L/D)_{\phi,exp}$ | relación de masas lípido/DNA en la electroneutralidad experimental   |
| $l$                | separación entre electrodos  |
| $l$                | longitud promedio del fragmento de DNA   |
| $l_B$              | longitud de Bjerrum  |
| $l_C$              | longitud crítica de la cadena hidrófoba  |
| $l_p$              | longitud del DNA   |
| $M_{bp}$           | peso molecular promedio de un par de bases del DNA   |
| $M_{L^+}$          | peso molecular del lípido catiónico  |
| $M_{L^0}$          | peso molecular del lípido zwitteriónico  |
| $N$                | número de segmentos de DNA   |
| $N_{agg}$          | número de agregación micelar   |
| $N_i$              | número de iones  |
| $N_\phi$           | número de segmentos de DNA necesarios para neutralizar 1 liposoma  |
| $N.A.$             | apertura numérica  |
| $n$                | número de átomos de carbono que corresponde a la longitud del espaciador que une las 2 cabezas polares de los sistemas catiónicos gemini |
| $n_r$              | índice de refracción   |
| $n_+$              | número de moles de cargas positivas  |
| $n_-$              | número de moles de cargas negativas  |
| $n_C$              | número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada de un liposoma   |
| $n_i$              | concentración de iones   |
| $n_{L^+}$          | moles de lípido catiónico  |
| $n_{L^0}$          | moles de lípido zwitteriónico  |
| $P$                | concentración de segmentos de DNA  |
| $P_0$              | concentración de segmentos de DNA en equilibrio con los complejos liposoma-DNA   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| $P_a(S)$        | concentración de segmentos de DNA a la cual los complejos se agregan para formar “clusters”  |
| $P_d(S)$        | concentración de segmentos de DNA a la cual los “clusters” se desagregan en complejos libres |
| $P_e$           | parámetro de empaquetamiento   |
| $P_{free}$      | concentración de segmentos de DNA libres en disolución                                       |
| $P_\phi(S)$     | concentración de segmentos de DNA a la cual los “clusters” son eléctricamente neutros        |
| $p(r)$          | distribución de la distancia par   |
| $Q$             | carga de liposomas o micelas   |
| $Q^*$           | carga de lipoplejos  |
| $Q^*_{max}$     | magnitud máxima de la carga de los lipoplejos  |
| $Q_C$           | carga de 1 complejo liposoma mixto-DNA   |
| $\frac{Q_C}{C}$ | potencial electrostático medio en la superficie del complejo                                 |
| $Q_S$           | carga de 1 liposoma  |
| $Q_{S,ren}$     | carga teórica renormalizada de 1 liposoma  |
| $Q_p$           | carga de 1 segmento de DNA   |
| $Q_{p,ren}$     | carga teórica renormalizada de 1 segmento de DNA   |
| $q$             | vector de ondas  |
| $-q$            | carga de un polielectrolito de longitud flexible de signo opuesto al de los liposomas        |
| $q_L^+$         | cargas efectivas positivas del lípido catiónico  |
| $q_{ctDNA}^-$   | cargas efectivas negativas del par de bases del DNA lineal                                   |
| $q_{pDNA}^-$    | cargas efectivas negativas del par de bases del plásmido DNA                                 |
| $q_{ctDNA}$     | vector de ondas del DNA lineal   |
| $q_{pDNA}$      | vector de ondas del plásmido DNA   |
| $q_n$           | carga neta del complejo  |
| $R$             | radio de los liposomas   |
| $Re$            | nº de Reynolds   |
| $R_H^{app}$     | radio hidrodinámico aparente   |
| $r$             | anisotropía de fluorescencia   |
| $r_C$           | distancia al centro de la partícula esférica   |

|                    |  |
|--------------------|--|
| $S$                | concentración de liposomas   |
| $S_a(P)$           | concentración de liposomas a la cual los complejos comienzan a formar “ <i>clusters</i> ”      |
| $S_d(P)$           | concentración de liposomas a la cual los “ <i>clusters</i> ” se desagregan en complejos libres |
| $S_\phi(P)$        | concentración de liposomas a la cual los “ <i>clusters</i> ” son neutros                       |
| $T$                | temperatura  |
| $T_K$              | temperatura de Krafft  |
| $T_m$              | temperatura de transición de fase termotrópica gel-fluido                                      |
| $t$                | tiempo   |
| $V$                | volumen  |
| $V$                | velocidad del fluido   |
| $v_0$              | volumen normalizado  |
| $v$                | volumen de las cadenas hidrocarbonadas   |
| $v$                | velocidad de migración   |
| $x$                | fracción de liposomas que forman parte de los “ <i>clusters</i> ”                              |
| $z_i$              | valencia de los iones  |
| $\alpha$           | ángulo entre las transiciones de absorción y emisión de fluorescencia                          |
| $\gamma$           | semiángulo de recopilación de la lente magnificadora del microscopio                           |
| $\delta$           | distancia de resolución mínima   |
| $\partial$         | densidad del fluido  |
| $\epsilon_0$       | permitividad del vacío ( $= 8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ m}^{-1}$ )                |
| $\epsilon_r$       | permitividad relativa  |
| $\epsilon_\lambda$ | coeficiente de extinción molar   |
| $\zeta$            | potencial dseta o zeta   |
| $\eta$             | viscosidad del disolvente  |
| $\theta$           | ángulo del dipolo de emisión de un fluoróforo con respecto al eje z                            |
| $\kappa$           | conductividad específica   |
| $\kappa_D^{-1}$    | longitud de Debye, espesor de la doble capa eléctrica  |
| $\bar{\Lambda}$    | número medio de pares de bases que contiene un segmento de DNA                                 |
| $\lambda$          | longitud de onda de la radiación   |
| $\lambda_{em}$     | longitud de onda de emisión  |
| $\lambda_{ex}$     | longitud de onda de excitación   |



|                |   |
|----------------|---|
| $\mu$          | viscosidad  |
| $\mu_c(N)$     | potencial químico debido a la correlación del DNA con el complejo |
| $\mu_e$        | movilidad electroforética   |
| $\mu_l$        | fuerza iónica   |
| $\sigma_\zeta$ | densidad de carga superficial                                     |
| $\Phi$         | número de lípidos por liposoma                                    |
| $\phi$         | rendimiento cuántico  |
| $w$            | carga del DNA ( $C/e$ )   |

## RESUMEN

La terapia génica es un nuevo campo de la medicina cuyo objetivo es curar una amplia variedad de enfermedades a nivel molecular, o por medio de la substitución de DNA celular dañado o mediante la inserción de genes funcionales en células vivas. El potencial de esta vía es muy elevado, dada su capacidad de tratar enfermedades que, hasta el momento, han sido paliadas sólo en parte o no tienen curación. Debido al carácter multianiónico del DNA, su compactación y transporte a través de las membranas celulares cargadas negativamente es limitado, por lo que necesita sistemas que sean capaces de compactarlo, transportarlo a través de la membrana hacia el interior del núcleo y, finalmente, liberarlo. En relación a este punto, la Química Coloidal y Supramolecular juega un papel fundamental, debido a que los complejos coloidales liposoma mixto-DNA, denominados lipoplejos, son de especial importancia por su capacidad de transportar, compactar y proteger segmentos de DNA hasta su llegada a la célula diana. De hecho, junto con las nanopartículas magnéticas y las cápsulas poliméricas, se revelan como los vectores génicos del futuro, capaces de desplazar a los bien conocidos vectores virales, de reconocida eficacia y también peligrosidad por lo que al desencadenamiento de respuesta inmune respecta.

El objetivo fundamental de esta Tesis es aportar información fisicoquímica y bioquímica que permita ayudar a comprender y discernir, desde un punto de vista biofísico y bioquímico, el comportamiento de los lipoplejos a pH fisiológico, sus características y propiedades, así como su eficiencia en la transfección del DNA y su viabilidad/toxicidad celular, cara a su potencial aplicación en terapia génica.

Para ello, se han estudiado y caracterizado seis liposomas mixtos, constituidos por un lípido catiónico (CL) (de una o dos cabezas polares) y un fosfolípido zwitteriónico, DOPE, a diferentes fracciones molares,  $\alpha$ , del lípido catiónico en el liposoma mixto y, para cada fracción molar, a una amplia gama de relaciones de carga entre el liposoma catiónico y el biopolímero aniónico,  $\rho$ . Se han escogido diversos lípidos catiónicos que poseen características estructurales distintas: *i)* de los derivados del colesterol se ha seleccionado el *cloruro de 3- $\beta$ -del lípido-colesterol* (DC-Chol), que posee un conjunto de cicloalcanos en la región hidrofóbica con forma globular y un grupo polar voluminoso formado por el carbamato N-sustituido; *ii)* el *cloruro de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina* (DOEPC), que posee una cabeza polar y dos cadenas hidrofóbicas de 18 átomos de carbono con una insaturación olefínica *cis* en la posición 9, lo que le confiere mayor

fluidez a la bicapa lipídica; y *iii*) cuatro lípidos *gemini* catiónicos sintetizados en este trabajo, de la serie *1,2-bis (hexadecildimetilamonio)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>* ó  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio))_2C_n$ , siendo  $n = 2, 3, 5$  ó  $12$ , la longitud de la cadena alquílica espaciadora que une las dos cabezas polares, y todos ellos con dos cadenas hidrofóbicas saturadas de 16 átomos de carbono.

La elección del lípido catiónico ha permitido estudiar el efecto que tiene sobre las propiedades fisicoquímicas, estructurales y bioquímicas de los lipoplejos, el tipo de grupo polar, el tamaño y la forma de la región hidrofóbica (una o dos cadenas, o bien forma globular), si poseen una o dos cabezas polares, y/o la longitud de la cadena alquílica espaciadora que une las dos cabezas polares en los lípidos catiónicos *gemini*. Como fosfolípido zwitteriónico, que suele emplearse como coadyuvante en el transporte e inserción del DNA en la célula diana, se ha utilizado el *1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina* (DOPE), con 18 átomos de carbono y una insaturación en cada cadena, perteneciente a la familia de las fosfatidiletanolaminas y ampliamente utilizado por su eficiencia en la vectorización de DNA y por su reconocido carácter fusogénico con la membrana celular. El DOPE es un lípido de origen natural, con carga neta nula a pH fisiológico (pH = 7,4). Se ha podido estudiar el efecto que causa la presencia del lípido zwitteriónico, DOPE, en las propiedades del lipoplejo y en la eficiencia en la transfección del DNA, realizando un estudio en función de la fracción molar,  $\alpha$ , del lípido catiónico en el liposoma mixto, y de la relación de cargas efectivas CL mixto-DNA,  $\rho_{eff}$ . En el proceso de compactación del DNA y formación de la estructura del lipoplejo, también se ha analizado el grado de insaturación de las cadenas hidrofóbicas de los lípidos y la diferente longitud de las mismas puesto que influyen en la eficiencia de la transfección. Con el fin de estudiar todos estos efectos, se han estudiado los siguientes liposomas catiónicos mixtos: DC-Chol/DOPE, DOEPC/DOPE y  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio))_2C_n$ /DOPE, con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , cubriendo un amplio intervalo de fracciones molares del CL,  $\alpha$ .

Por otra parte, se ha escogido un DNA lineal comercial liofilizado proveniente del timo de ternero (*Calf-Thymus DNA*), y un plásmido circular superenrollado, el pEGFP-C3 (pDNA), amplificado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la UCM.

El estudio de los seis lipoplejos, DC-Chol/DOPE-ctDNA, DOEPC/DOPE-ctDNA y  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio))_2C_n$ /DOPE-pDNA, con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , se ha realizado cubriendo un amplio intervalo de relaciones de carga efectiva lípido catiónico-DNA,  $\rho_{eff}$ , sabiendo que

esta relación es uno de los factores más influyentes en el comportamiento de estos vectores coloidales de DNA.

En esta Tesis se han desarrollado nuevos protocolos de preparación y optimización de los liposomas y lipoplejos, y nuevas metodologías de trabajo tanto en varias de las técnicas experimentales utilizadas como en los estudios teóricos. También se han utilizado, por primera vez por nuestro grupo (en colaboración con otros investigadores de otros grupos) varias técnicas bioquímicas para la determinación de la eficiencia en la transfección del DNA y la viabilidad celular de los lipoplejos objeto de estudio. Además, esta Tesis, ha demostrado y justificado experimentalmente, por primera vez, por qué se requiere menos lípido catiónico para transfectar el plásmido DNA (pDNA) que para transfectar el DNA lineal (ctDNA).

Para llevar a cabo el estudio biofísico y bioquímico de los liposomas y lipoplejos, cubriendo un amplio intervalo de fracciones molares del CL,  $\alpha$ , en el liposoma mixto y de relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , entre el lípido catiónico y el DNA, se han escogido una amplia gama de técnicas experimentales de alta precisión: *i*) electroquímicas, como la movilidad electroforética/potencial zeta, y la electroforesis en gel de agarosa; *ii*) espectroscópicas, como la espectroscopia de fluorescencia (ensayo de intercalación de sondas fluorescentes en el DNA y anisotropía de fluorescencia) y la espectroscopia UV-VIS (utilizada para el ensayo de pureza del DNA); *iii*) de microscopia, como la criomicroscopia electrónica de transmisión (crio-TEM) y microscopia confocal de fluorescencia; *iv*) de dispersión, como la dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS); y *v*) bioquímicas, como la citometría de flujo (FACS), y el ensayo de reducción del MTT. Las técnicas electroquímicas han aportado información acerca del tipo de interacción entre los liposomas mixtos y el DNA y han permitido, además, la determinación experimental de la relación liposoma-DNA en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , que tiene lugar cuando las cargas negativas aportadas por el DNA son contrarrestadas por las positivas de los lípidos catiónicos. Este parámetro es clave en las propiedades de los lipoplejos, y ha sido confirmado con la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Con el potencial zeta también se han determinado, por primera vez, las cargas efectivas del lípido catiónico,  $q_L^+$ , y del plásmido DNA,  $q_{pDNA}^-$ . Los experimentos de espectroscopia de fluorescencia con intercalación de sondas fluorescentes también han permitido determinar el valor de la electroneutralidad y constatar, mediante un análisis de los espectros obtenidos, el tipo de interacción que tiene lugar en la formación de los lipoplejos. Con la anisotropía de

fluorescencia se ha analizado la fluidez de las bicapas lipídicas que se forman cuando el DNA interacciona con el liposoma mixto formando los lipoplejos. El tamaño, la forma y la estructura de los lipoplejos en ausencia y en presencia de DNA se han analizado con la crio-microscopía electrónica de transmisión (crio-TEM) y la dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS). El tamaño de los liposomas mixtos utilizados se ha constatado, además, mediante la determinación del radio hidrodinámico con la ayuda del equipo zetaPALS. Para determinar el grado de compactación y transporte del pDNA, la eficiencia en transfección y la viabilidad celular de estos vectores coloidales, se han utilizado varias técnicas bioquímicas: citometría de flujo (FACS), microscopía confocal de fluorescencia y ensayo de reducción del MTT (% viabilidad celular/citotoxicidad). Con estas técnicas se ha determinado de una manera cuantitativa y/o cualitativa la % de GFP expresada en las células, es decir, el % de células transfectadas, y la citotoxicidad que producen los lipoplejos al ser transfectados a las células.

Esta caracterización experimental de lipoplejos se ha ampliado con el desarrollo y aplicación de un estudio teórico, con el que se ha obtenido el diagrama de fases de los lipoplejos, analizándose también los procesos de agregación-desagregación en el que están implicados. El análisis teórico ha permitido obtener parámetros fenomenológicos importantes en la formación de los lipoplejos, como son: la energía de unión entre un liposoma y DNA, la concentración de DNA libre en equilibrio con los lipoplejos, cuya carga está neutralizada, y los valores teóricos de la electroneutralidad,  $(L/D)_{\phi,teo}$ , o  $S_{\phi,teo}$ , los cuáles han resultado estar en concordancia con los obtenidos experimentalmente.

El conjunto de técnicas experimentales utilizadas junto con el estudio teórico realizado ha permitido analizar la capacidad de los liposomas mixtos estudiados en esta Tesis como vectores coloidales del DNA, así como su eficacia para compactarlo, transportarlo a través de la membrana y liberarlo en el interior de las células, es decir, su capacidad para transfectar el DNA en estudios *in vitro*, y, por consiguiente, su potencial futuro como vectores en terapia génica.

# CAPÍTULO 1

## ***TERAPIA GÉNICA:***

## ***ANTECEDENTES Y ACTUALIDAD***

*En este capítulo se describe detalladamente el estado actual de la terapia génica y los métodos contemporáneos de inserción génica en las células. Posteriormente se presentan las características estructurales, biofísicas y bioquímicas más importantes del DNA, explicando su condensación natural. Finalmente se describen, desde un punto de vista biofísico y bioquímico, los agregados coloidales (liposomas) y los lipoplejos, formados cuando los liposomas condensan, compactan, protegen y transportan el DNA al interior celular.*



## 1.1. TERAPIA GÉNICA

### 1.1.1. PRECEDENTES HISTÓRICOS

Desde tiempos remotos, el ser humano ha luchado por prevenir y tratar en la medida de lo posible las distintas afecciones que en el devenir de la historia han ido apareciendo. Poco a poco, las ciencias ocultas dejaron paso a la alquimia en el remedio curativo, logrando una mejora sustancial en la calidad de vida del hombre. Sin embargo, serían los avances tecnológicos y científicos alcanzados a lo largo del siglo pasado los que permitirían un aumento en la esperanza de vida del ser humano, hasta situarla a límites antes insospechados. Quizá sea este hecho el que defina al siglo XX como el *Siglo de la Revolución Científico-Tecnológica*. No obstante, es ahora, a principios del nuevo milenio, cuando estamos contemplando un nuevo avance para la Humanidad, al comenzar a comprender las condiciones de las enfermedades a nivel molecular, aliviar sus síntomas y eliminar sus causas. Este esfuerzo humano, tecnológico y económico mantiene abiertas las puertas de un esperanzador y prometedor futuro gracias a las trascendentales aportaciones de tres principales disciplinas científicas, la Bioquímica, la Genética y la Química que, si bien pueden actuar por separado, se interrelacionan y confluyen en lo que se ha denominado terapia génica.

El florecimiento y desarrollo de la Bioquímica y la Genética ha contribuido notablemente a la mejora en la calidad de vida del hombre. Investigaciones iniciadas en el siglo XIX por científicos tan prestigiosos como *Mendel* (con la instauración de las Leyes Hereditarias) o *Miescher* (con el descubrimiento de los ácidos nucleicos)<sup>1</sup> y continuadas por otros muchos no menos importantes,<sup>2-5</sup> culminaron con el hallazgo de *Watson y Crick* de la estructura y replicación de la doble hélice del DNA en 1953.<sup>1,6</sup> A partir de este descubrimiento, los avances científicos han continuado hasta nuestros días obteniéndose una mejor comprensión de los ácidos nucleicos y su manipulación genética. De modo similar, tampoco se han escatimado esfuerzos en el estudio estructural y funcional de los genes, no sólo en el desarrollo normal de la vida celular, sino también en el origen a nivel molecular de determinadas enfermedades.<sup>7</sup> Todo este impulso ejercido en la búsqueda del conocimiento bioquímico y genético ha permitido concluir el *Proyecto Genoma Humano (HGP)*,<sup>8</sup> consiguiendo de este modo detallar la secuencia de los 2,9 billones de pares de bases de nuestro genoma. Sin embargo, a pesar de todo el camino recorrido, aún queda mucho trabajo para terminar de comprender y descifrar la funcionalidad proteínica de nuestro genoma e



intervenir de raíz en los fallos genéticos, con el fin de prevenir o evitar las enfermedades que de ellas se derivan.

De manera paralela a la Biología Molecular, también es notable el papel desempeñado por la Química Coloidal y Supramolecular. Esta especialidad de la Química se desarrolló a partir de las observaciones de *Graham* realizadas en 1861 con macromoléculas capaces de agregarse y dispersarse uniformemente en medios fluidos, a las que denominó *coloides* (derivado del griego *κολλα* – pegamento).<sup>9</sup> A partir de estas percepciones, *Graham* definió el intervalo de tamaños de partícula que caracteriza el dominio coloidal, todavía hoy ampliamente utilizado y que, junto a otros trabajos precursores, le darían el sobrenombre de *padre de la Ciencia Coloidal*. Ya a comienzos del s. XX, *Freundlich* realizó sustanciales avances en la comprensión de los coloides, esclareciendo el comportamiento viscoelástico de determinados geles y sugiriendo la primera clasificación de dispersiones coloidales: liofílicas o liofóbicas.<sup>10</sup> Prácticamente al mismo tiempo, *Svedberg* describía un nuevo método para producir partículas coloidales y estudiaba determinadas propiedades de las mismas, tales como la difusión, la absorción de luz y la sedimentación.<sup>11</sup> El trabajo de *Svedberg* sería de vital importancia al establecer la conexión entre la química descriptiva y la física teórica, dando validez a la ecuación de *Stokes-Einstein* (que vincula el movimiento browniano con los coeficientes de difusión)<sup>12</sup> y a la ecuación de *Smoluchowski* (que relaciona la cinética de coagulación y la difusión de dos partículas con movimiento browniano),<sup>13</sup> desarrolladas en 1905 y 1918 respectivamente. Significativos avances en la estabilidad coloidal se obtuvieron en los años 40, cuando los soviéticos *Derjaguin* y *Landau* y los holandeses *Verwey* y *Overbeek* desarrollaron de manera independiente la conocida *teoría DLVO*.<sup>14,15</sup> La importancia de esta teoría reside en su capacidad para explicar la estabilidad de los coloides en función de la combinación de dos fuerzas de interacción presentes en el sistema: la repulsión electrostática y la fuerza atractiva universal. Aún más, los inicios de *Hartley* y *Bangham* en estructuras coloidales como las micelas<sup>16</sup> o las vesículas,<sup>17</sup> respectivamente, abrirían las puertas a un enorme campo científico, entre el que cabe destacar la vectorización farmacológica, que aún hoy suscita elevado interés.

En los últimos 30 años se ha corroborado la interrelación entre la Biología Molecular y la Química Coloidal y Supramolecular. Ésta participa en el conocimiento de las membranas celulares esclareciendo las diferentes transiciones de fase, funcionalidades y mecanismos de fusión o reconstitución y construyendo modelos de membrana capaces de explicar sus propiedades fisicoquímicas. Del mismo modo, contribuye a la comprensión en la vectorización de DNA (un enorme polielectrolito) mediante agregados coloidales, e interpreta

los mecanismos de inserción en células dañadas genéticamente, posibilitando avances en materia de terapia génica. Con ello, la carrera investigadora por evitar y/o aliviar las enfermedades ha adquirido una nueva velocidad y, actualmente, el número de publicaciones que incrementan los conocimientos en este campo no deja de crecer.

### **1.1.2. BASES ACTUALES**

Conocidos la secuencia y mapa del genoma humano, así como las bases genéticas de muchas enfermedades, las investigaciones relacionadas con la terapia génica se han ampliado extraordinariamente. La terapia génica es una tecnología altamente prometedora en la práctica médica que tiene por objetivo primordial curar las enfermedades a nivel molecular, reparando posibles daños del DNA celular, y, sobre todo, impidiendo que estos se produzcan, mediante la inserción y expresión de genes funcionales con una secuencia informativa y codificada en el interior de un célula viva, donde se espera que desempeñe la función terapéutica deseada y prediseñada.<sup>18-22</sup> Otra vía alternativa supone la inserción del gen no con el objeto de reemplazar el material defectuoso sino con la idea de bloquear o silenciar su función. Por tanto, la idea central de la terapia génica se basa en la utilización de ácidos nucleicos capaces de: i) reemplazar y reparar, o ii) bloquear o silenciar una función patogénica celular específica asociada a un gen diana. Esta acción de silenciar la función de un gen defectuoso se conoce como “silenciación génica” (*Gene Silencing*) y se basa en la idea de que un gen que supuestamente debería expresarse a nivel celular, es “desconectado”, “apagado” (silenciado) en la célula mediante una metodología adecuada, de tal forma que se paraliza la expresión de la proteína patogénica correspondiente.

La terapia génica puede utilizarse para tratar enfermedades cuyo origen resida en desórdenes genéticos, por pérdida o defecto de determinados genes funcionales. La mayoría de las veces, los desórdenes en códigos genéticos no funcionales no tienen ninguna consecuencia estructural, y aparentemente las proteínas que se sintetizan a partir del DNA son normales. Sin embargo, ciertas mutaciones que afectan a regiones reguladoras u otras secuencias no informativas del gen y que no determinan proteína, pueden cambiar el patrón de expresión en cuanto a la cantidad del producto expresado, o inactivar completamente la función proteínica y ser letales para la célula. Si las mutaciones ocurren en genes funcionales, la síntesis de la proteína puede o bien detenerse, sin la consiguiente fabricación de la misma, o bien generar una nueva proteína diferente a la esperada y por tanto, con propiedades totalmente distintas.<sup>23,24</sup> Los sistemas de detección y reparación de errores celulares durante la replicación del DNA consiguen reducir la tasa de mutación de  $10^{-6}$  a  $10^{-10}$  errores por cada

par de bases (es decir, menos de un par de bases mutadas en cada división celular). No obstante, la tasa de mutación global se ve incrementada debido a reacciones con mutágenos químicos del ambiente o a la exposición de radiación ionizante. Al contrario que las reparaciones de mutaciones ocurridas durante la replicación, las reparaciones en el DNA dañado por agentes externos se mantienen como mutaciones permanentes, aunque sólo un pequeño porcentaje de estos cambios afectan a las células germinales y quedan fijados en el genoma de la especie.<sup>23,24</sup> Ambos tipos de mutaciones, ya sean hereditarias o provocadas por determinados factores ambientales, pueden revertir en el desarrollo de cientos de enfermedades:<sup>1,23</sup>

- i. Genéticas (fibrosis quística, enfermedad de Gaucher, anemia drepanocítica, talasemia, hemofilia, hipercolesterolemia familiar, etc.),
- ii. Determinados tipos de cánceres,
- iii. Neurológicas (Alzheimer, Parkinson, etc.),
- iv. Cardiovasculares (arterioesclerosis, trombosis, isquemia, etc.) y,
- v. Otras enfermedades como la diabetes o la osteoporosis.

Todas estas enfermedades podrían ser mitigadas consiguiendo que las convenientes células sintetizasen las proteínas perdidas o mutadas, una vez se hubiese transportado el apropiado gen.<sup>1,25</sup> En la actualidad se están investigando estrategias como la inserción de genes suicidas en células tumorales capaces de transformar un pro-fármaco inactivo en su forma activa, o la suplementación de células malignas con genes supresores tumorales.<sup>23</sup> La terapia génica también incluye la reactivación del sistema inmune mediante la marcación de células tumorales, con el fin de provocar la destrucción autoinmunológica, y la vacunación, con la cual el cuerpo es capaz de producir sus antígenos para inducir la respuesta inmune. Además de las enfermedades genéticas hereditarias, con estos tratamientos podría hacerse frente a enfermedades infecciosas (SIDA, hepatitis B y C, herpes, gripe, etc.), agentes patógenos (parásito de la malaria) y/o ciertos estados inflamatorios (asma, artritis, etc.).<sup>1</sup> Finalmente, la terapia génica podría utilizarse para proteger a las células sanas durante la quimioterapia o para crear mecanismos de resistencia a fármacos insertando enzimas degradantes.<sup>1,26</sup>

De este modo, la terapia génica tiene la oportunidad de alcanzar una substancial mejora de la curación/mitigación o incluso la prevención de un variado número de enfermedades. En la tabla 1.1 se expone un listado de algunas enfermedades genéticas con posibilidad de tratamiento mediante terapia génica.

**Tabla 1.1.** Enfermedades genéticas candidatas a ser tratadas mediante terapia génica. (Fuentes: I. M. Verma; N. Somia. *Nature* **1997**, 389, 239 y *Genes and Disease*; *National Library of Medicine, NBCI, EE. UU.*, 2004).

| ENFERMEDAD                                     | DEFECTO   | INCIDENCIA                                     |
|--|---|--|
| Inmunodeficiencia severa combinada             | Adenosina desaminasa (ADA) en un 25% de pacientes con SCID  | Rara   |
| Hemofilia A/B                                  | Deficiencia de la proteína Factor VIII/IX   | 1:10000/30000 varones                          |
| Hipercolesterolemia familiar                   | Deficiencia del receptor LDL (lipoproteína de baja densidad)                                      | 1:1 millón                                     |
| Fibrosis quística                              | Transporte defectuoso de sal en el epitelio pulmonar. Los pulmones se llenan de secreción mucosa. | 1:3000 caucásicos                              |
| Talasemia/anemia drepanocítica                 | Defectos estructurales en la alfa- o beta-hemoglobina. Obstrucción de arterias.                   | 1:600 en ciertas etnias                        |
| Enfermedad de Gaucher                          | Defecto de la enzima glucocerebrosidasa   | 1:450 judíos asquenacés                        |
| Enfisema heredado                              | Carencia de alfa-antitripsina   | 1:3500   |
| Retinoblastoma                                 | Tumor en la retina  | 1:20000 niños                                  |
| Diabetes tipo I                                | Mutación en cromosoma 6 y/o 7   | 1:19   |
| Cánceres, tumores                              | Muchas causas: medio ambiente, hereditarias, etc.   | 1 millón/año en EE.UU.<br>160000/año en España |
| Alzheimer                                      | Degeneración nerviosa, senilidad prematura  | 4 millones en EE.UU.                           |
| Parkinson                                      | Degeneración neuromuscular  | 1 millón en EE.UU.                             |
| Cardiovasculares: restinosis, arteroesclerosis | Defecto en lipoproteína E, incremento de colesterol en sangre y obstrucción de vasos.             | 13 millones en EE.UU.                          |
| Asma   | Inflamación de las vías respiratorias   | 10 millones en EE.UU.                          |
| Enfermedades infecciosas                       | SIDA, hepatitis B/C, gripe, malaria   | Incrementándose                                |

### 1.1.3. TRANSFECCIÓN

¿Cuál es el obstáculo principal al que nos enfrentamos para no aplicar de manera extensa la terapia génica? A pesar de que muchos son los ensayos clínicos que actualmente se llevan a cabo en todo el mundo para evaluar la seguridad y la eficacia de la terapia génica,<sup>23</sup> ¿por qué ninguno ha conseguido un éxito rotundo? Para responder a estas cuestiones debemos definir las distintas etapas de las que constaría el tratamiento:<sup>1,23,25</sup>

- i. Diagnóstico acertado de la enfermedad y del defecto genético. Conlleva, además de los métodos clásicos de diagnóstico, el conocimiento exhaustivo del tipo de órgano o células diana, el número de células y una reconstrucción de la historia genética familiar.
- ii. Construcción adecuada del plásmido o plásmidos (segmento de DNA independiente capaz de replicarse).
- iii. *Transfección* (transporte de un gen con una secuencia codificada determinada) efectiva y segura al interior de la célula. Se debe haber llevado a cabo un estudio pormenorizado de diseño y optimización del sistema de transporte de DNA o vector génico.
- iv. Liberación del gen en la célula diana y posterior entrada en el núcleo.
- v. Expresión genética (síntesis en las células diana de la subsiguiente proteína codificada). Requiere un estudio detallado de la duración de la expresión y la posibilidad de que se de en células cuando se produce o no la división celular.

Actualmente, tanto los operativos que permiten llevar a cabo una acertada diagnóstico médica, como la síntesis del plásmido en laboratorio, están plenamente desarrollados. Sin embargo, existen limitaciones tanto en la tipología de las células diana a tratar (hasta el momento sólo se llevan a cabo procesos en células no reproductivas), así como en saber cuantas células van a ser tratadas, en función de la cantidad de proteína que necesitemos expresar.<sup>25</sup> Sin embargo, el mayor escollo reside en la inserción y liberación de genes en la célula diana (es decir, la transfección) de manera selectiva y efectiva, obteniendo así la expresión de la proteína deseada. Actualmente es la etapa más complicada, menos evolucionada y la que más problemas conlleva, sobre todo cuando ésta se lleva a cabo *in vivo*.<sup>1,25</sup>

En una primera aproximación a la problemática de la transfección, hay que considerar el tamaño del plásmido que va a ser insertado en la célula diana. Si por cada par de bases existen dos cargas negativas (aportadas por cada fosfato de ambas hebras) y un peso de unos

650 g/mol de pares de bases y, considerando que los segmentos de DNA usados normalmente suelen contener entre 3000 y 15000 pares de bases, podemos estimar que éstos tendrán un peso de entre  $2 \cdot 10^6$  y  $10 \cdot 10^6$  uma y entre 6000 y 30000 cargas negativas por segmento.<sup>1</sup> Tal tamaño y tal cantidad de carga da que pensar si tenemos en cuenta que queremos introducir esta macromolécula en el interior del núcleo de la célula. Para ello el DNA debe atravesar dos barreras permeables que están negativamente cargadas: las membranas celular y nuclear. Por otro lado, hay que señalar que nuestro organismo contiene DNA-nucleasas, enzimas capaces de degradar DNA libre extracelular como medida de protección frente a DNA patógeno. Por tanto, la transfección *in vivo* adquiere una mayor problemática en el caso de la administración sistemática.<sup>1</sup>

Como se muestra en la tabla 1.2, son muchos los métodos de transfección génica que se han desarrollado hasta la fecha, destacando fundamentalmente los métodos mecánicos, físicos, químicos y bioquímicos. Sin embargo, la mayoría de ellos han demostrado poca eficiencia<sup>25,27</sup> y/o son sólo aplicables *in vitro*.<sup>1,28</sup>

De todos los métodos físicos y mecánicos, sólo se ha demostrado una cierta efectividad en estimulación inmunológica *in vivo*, inyectando directamente DNA desnudo en células musculares de extremidades<sup>1,29</sup> o en melanoma<sup>1,30</sup> de ratón. Algunos ensayos han alcanzado niveles de expresión suficientes para conseguir inmunización frente a proteínas virales, tumorales, etc. Otro método mecánico utilizado es la transferencia génica balística (o pistola génica) en la que el DNA terapéutico se adsorbe sobre una superficie de bolas microscópicas de oro u otro metal inerte y son disparadas a presión sobre el órgano diana; sin embargo sólo se ha aplicado en la piel dado su bajo nivel de penetración.<sup>1,23</sup>

El método más extendido actualmente tanto en tratamientos *ex vivo* (extracción de las células elegidas, cultivo *in vitro* y posterior reinserción de las células en el organismo) como en algunas aplicaciones *in vivo*, es la inserción de DNA o RNA vírico con algunas secuencias borradas o reconstruidas utilizando virus no infectivos.

**Tabla 1.2.** Métodos de transfección más comunes.

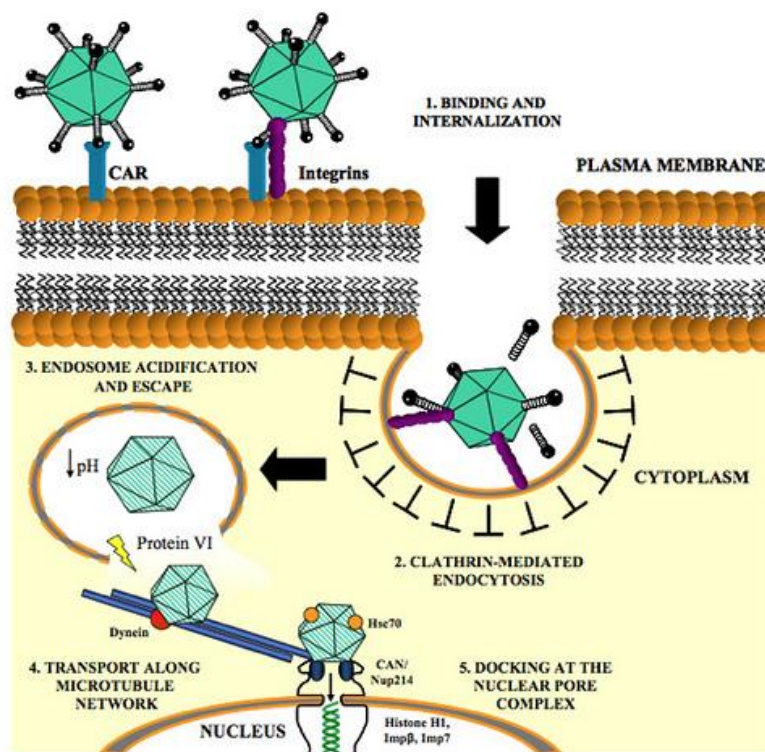
|                    |   |   |
|--------------------|---|---|
| <b>Mecánicos</b>   | { | Microinyección en el núcleo de la célula  |
|                    | { | Disparo de partículas de oro recubiertas de DNA con pistola de genes  |
|                    | { | Métodos con láser, con quema transitoria de poros   |
|                    | { | Corte con aguja cristalina cubierta con DNA   |
| <b>Físicos</b>     | { | Choque osmótico   |
|                    | { | Congelación-descongelación  |
|                    | { | Ultrasonificación   |
|                    | { | Electroporación   |
| <b>Químicos</b>    | { | Complejación del DNA usando fosfato cálcico, polielectrolitos catiónicos (dextrano, polibreno, polietilenamida, etc.), polipéptidos o proteínas, o una combinación de ellos     |
|                    | { | Sistemas coloidales: complejación con liposomas convencionales (cargados positivamente, sensibles al pH, fusionados con los genes, etc.) y estabilización estérica de liposomas |
|                    | { | Virosomas y otras micropartículas   |
|                    | { |   |
| <b>Bioquímicos</b> |   | Utilización de sistemas víricos o bacterianos como medio de transporte  |

Entre ellos, los *retrovirus* y *adenovirus* son los más usados:<sup>1,25</sup>

- i. Los *retrovirus* más utilizados en terapia génica derivan de los lentivirus y oncovirus de tipo C. Los primeros pueden atravesar la membrana celular, a diferencia de los segundos. Ambos poseen una envuelta fosfolipídica, dentro de la cual retienen una cápside proteica de estructura icosaédrica con un RNA monocatenario en su interior. Son capaces de fundirse con la membrana celular y liberar la cápside, tras lo cual, cuando ésta llega a la membrana nuclear, se desensambla liberando el RNA.<sup>23</sup> Sin embargo, con los retrovirus tan sólo se consigue entre un 5 y un 10 % de efectividad y además, al incorporar el gen directamente en el cromosoma, presenta un potencial riesgo de carcinoma y/o infección.<sup>1,23</sup>
- ii. Los *adenovirus* son virus DNA sin envuelta, responsables de las principales enfermedades de las vías respiratorias altas. La cápside de la que constan se une a la membrana para introducirse posteriormente en el citoplasma mediante endocitosis, tal y como se muestra en la figura 1.1. A continuación, la cápside desestabiliza al endosoma, que se rompe y libera las partículas virales al citoplasma. Al llegar a la membrana nuclear son capaces de introducir el genoma

viral a través de los poros nucleares. Los adenovirus son más estables y fáciles de purificar, no necesitan la división celular para expresarse y son 10 veces más efectivos. Su principal inconveniente es la toxicidad que producen a dosis altas, y la fuerte respuesta inmune celular y humoral que sigue a su administración, con la consiguiente disminución de eficacia terapéutica.<sup>1,23</sup>

Otros tipos de virus también utilizados por su aparente seguridad y baja toxicidad son los *virus adenoasociados* capaces de transportar DNA monocatenario. No requieren división celular para la expresión, pero para completar su ciclo replicativo necesitan de un adenovirus o un herpes vírico que sobreinfecte la célula. Aunque son menos peligrosos, dado que no se incorporan en el genoma, tienen el inconveniente de una baja transfección, así como una baja capacidad de transporte de DNA y complicada síntesis.<sup>1,23</sup>



**Figura 1.1.** Ilustración esquemática del proceso de transfección biológica usando un adenovirus. El vector con DNA modificado se une a la membrana celular y entra en el citoplasma tras la formación de una vesícula y su posterior ruptura. El adenovirus inyecta a continuación el nuevo gen en el núcleo de la célula de tal manera que ésta puede expresar nuevas proteínas diana. (Fuente: Microbiology Bytes, EE. UU.).

En cualquier caso, los problemas asociados a la transfección vírica (posibles efectos cancerígenos, infecciosos, estados inflamatorios y desarrollo de respuesta inmune) hacen que las investigaciones en transfección génica se vean encaminadas hacia otras vías más eficaces, más seguras y menos nocivas.<sup>1,27</sup>



Quizás la posible solución al elevado tamaño y a la indefensión del DNA en zonas extracelulares, pueda ser complejarlo o condensarlo químicamente. A principios de los años 60, las investigaciones se dirigieron en el sentido de combinar al DNA con sustancias químicas capaces de neutralizarlo eléctricamente.<sup>27</sup> Se ha intentado utilizar polipéptidos como la poliarginina o polihistidina, pero su elevada toxicidad hace inviable la transfección *in vivo*. Mejores resultados se han conseguido utilizando polilisina con todos sus monómeros en configuración *L*, dado que este polipéptido es biodegradable y menos tóxico. Otros estudios llevados a cabo con policationes tales como la espermidina o espermina no han reflejado mejoras sustanciales en la efectividad de la transfección por inyección directa. También se han realizado algunas investigaciones con polímeros catiónicos, tales como la poli-vinilamina y la poli-vinilpiridina. Estos polielectrolitos tienen la capacidad de cargarse en soluciones ácidas de tal manera que podrían complejar el DNA en medio ácido y una vez en el citoplasma descondensarlo, protegiéndolo así de la acción de las nucleasas; aunque no se ha demostrado su efectividad *in vivo*. Polímeros estrella (dendrímeros), con estructuras similares a las histonas, sí han resultado efectivos, pero sólo en ensayos *in vitro*.<sup>1,23</sup>

A principios de los 80 apareció un nuevo método basado en la transfección con vectores coloidales,<sup>31,32</sup> como alternativa al resto de métodos químicos.<sup>1</sup> Básicamente, este método consiste en mezclar lípidos catiónicos, tanto de cadena doble como de cadena sencilla, con fosfolípidos y derivados del colesterol, formando así liposomas catiónicos mixtos. La posterior mezcla de estas estructuras coloidales con DNA permite la formación de un complejo denominado *lipoplejo*, con el que se consigue condensar, compactar y proteger el material génico. La inyección en seres vivos o la aplicación en cultivos celulares de estos complejos liposoma catiónico-DNA, va seguida de un proceso de transfección, conocido también como *lipofección*. En las estructuras de los complejos se pueden incluir además otros agentes diana, condensadores o fusogénicos que permitan una mejor unión a la membrana lipídica celular e incrementen así su biocompatibilidad. Hasta el momento, las investigaciones realizadas con lipoplejos han demostrado una menor efectividad en el proceso de transfección con respecto a los vectores víricos, si bien presentan una menor peligrosidad, toxicidad y respuesta inmune.<sup>1</sup> También se han estudiado complejos formados únicamente por surfactantes de cadena sencilla, que forman micelas, y DNA. Estos complejos micela-DNA, denominados *surfoplejos*, presentan un menor nivel de transfección que los lipoplejos y una toxicidad algo mayor. Sin embargo resultan más económicos y sencillos de producir.<sup>1</sup> En el apartado 1.3 se describirán los lipoplejos y los sistemas coloidales de los que se componen (liposomas), los cuáles son el eje principal de la presente Memoria. Otro tipo de

sistemas capaces de vehicular los ácidos nucleicos al interior celular son las nanopartículas inorgánicas (NPs), que tienen la ventaja de un relativamente fácil control de tamaños y prestaciones. Las NPs deben ser previamente funcionalizadas para cargarlas positivamente, requisito necesario para neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA o siRNA. Especial atención están recibiendo en los últimos tiempos las nanopartículas magnéticas (MNPs), por presentar la ventaja adicional de que el complejo MNP-DNA también conocido como *magnetoplejo*, puede ser dirigido por un campo magnético externo hacia su lugar de acción en el organismo, optimizando el proceso de transfección, en este caso denominado *magnetofección*.<sup>33</sup>

En resumen, hasta el momento muchos han sido los vectores de transferencia génica que se han investigado, mostrando efectividades dispares y en algunos casos, cierto efecto tóxico e inmune. La tabla 1.3 recoge las características de la transfección *in vivo* realizada con algunos de los vectores más importantes utilizados en la actualidad.

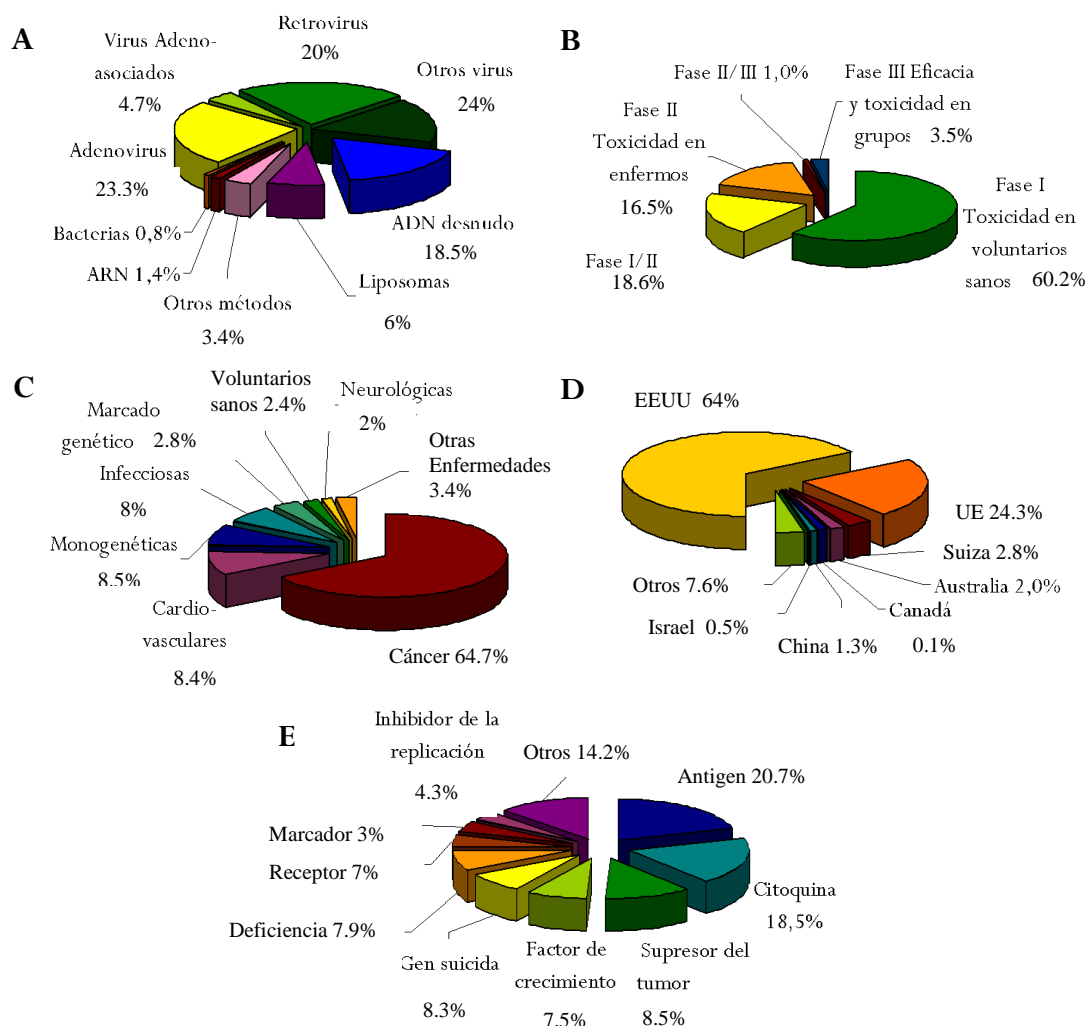
**Tabla 1.3.** Comparación de algunos métodos de transfección aplicados *in vivo*.<sup>a</sup>

| Vector génico                    | Riesgos en seguridad | Persistencia en el organismo | Capacidad de transporte | Selectividad celular |
|----------------------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Retrovirus                       | ++                   | ++                           | +                       | No                   |
| Adenovirus                       | +++                  | —                            | ++                      | No                   |
| Virus adenoasociados             | +                    | +                            | —                       | No                   |
| Virus sintéticos                 | ¿++?                 | ¿++?                         | ¿++?                    | Sí                   |
| Electroporación                  | —                    | +                            | ++                      | No                   |
| DNA desnudo                      | —                    | —                            |                         | Células musculares   |
| Poli-(L-lisina)                  | —                    | —                            | —                       | Células hepáticas    |
| Polímeros                        | —                    | —                            | ++                      | No                   |
| Liposomas +                      | —                    | —                            | ++                      | Potencial            |
| Liposomas —                      | —                    | —                            | +                       | Potencial            |
| Nanopartículas magnéticas (MNPs) | —                    | —                            | ++                      | Potencial            |

<sup>a</sup> Liposomas +, liposomas catiónicos; liposomas —, liposomas aniónicos; —, nivel bajo; +, nivel moderado; ++, nivel alto; +++, nivel muy alto; ¿++?, nivel posiblemente alto.

Los datos actualizados sobre los ensayos realizados en materia de terapia génica en los últimos veinte años se muestran en la figura 1.2. Como se puede observar, los vectores víricos ocupan dos terceras partes de las investigaciones realizadas en este campo, si bien los vectores no víricos (como los liposómicos) están adquiriendo un peso importante actualmente. También es destacable la fase temprana en la que se encuentran la mayoría de

los ensayos de aplicación de terapia génica, en los que tan sólo se han estudiado los efectos tóxicos de los vectores en individuos sanos.



**Figura 1.2.** Datos de los ensayos de terapia génica llevados a cabo sobre un total de 1786 pacientes en todo el mundo durante el periodo 1989-2011. A) Vectores de transferencia genética usados. B) Fases clínicas en las que se encuentran los ensayos. C) Enfermedades diana en las que se ha aplicado la terapia génica. D) Países en los que se han realizado los ensayos. E) Tipo de gen transferido. (Fuente: [www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/), J. Gen. Med., John Wiley & Sons, Ltd., Reino Unido, 2011).

## 1.2. EL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

### 1.2.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

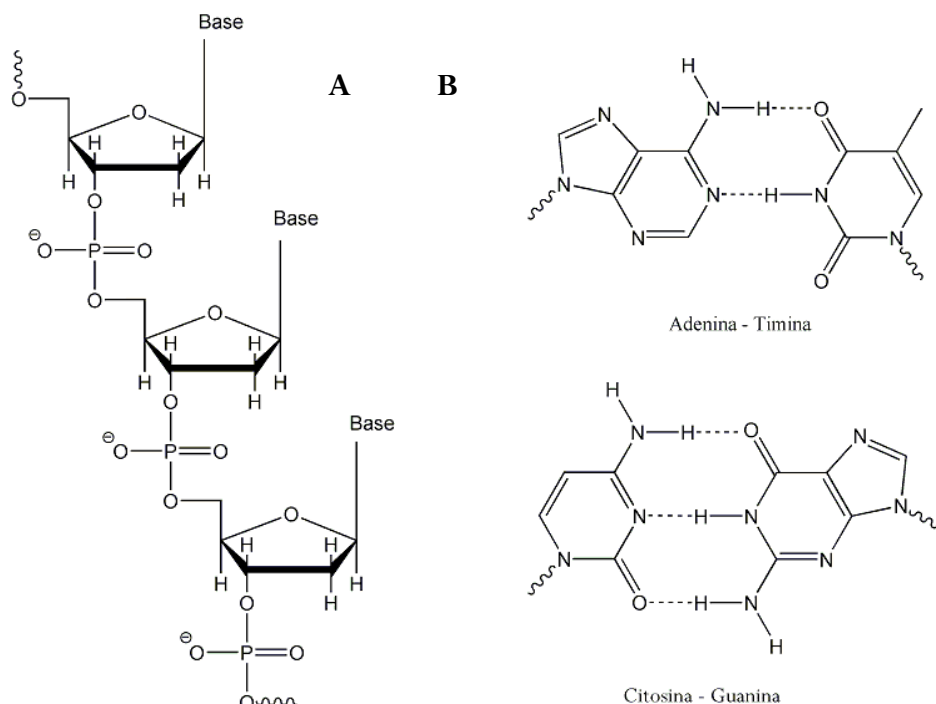
El ácido desoxirribonucleico o DNA es un polielectrolito compuesto de dos secuencias lineales de nucleótidos cuya naturaleza química constituye el grueso estructural de la macromolécula. Los nucleótidos están formados por una molécula de azúcar, la 2'-desoxirribosa, que ha sufrido la sustitución de los dos grupos hidroxílicos situados en

posiciones 1' y 3' por una base nitrogenada, bien purina (adenina o guanina) o pirimidina (citosa o timina), y por un grupo fosfato, respectivamente. Los distintos nucleótidos se unen por uniones fosfodiéster entre el carbono 5' de un nucleótido y el carbono 3' del siguiente para formar el polinucleótido de DNA, como se puede observar en la figura 1.3.A. Dos hebras sencillas de polinucleótidos se asocian mediante enlaces de hidrógeno (ver figura 1.3.B) entre las bases enfrentadas apareadas adenina-timina (dos enlaces) y guanina-citosa (tres enlaces), formando la doble hélice de DNA.<sup>1,6</sup> Esta especificidad en la formación de los enlaces de hidrógeno asegura que la secuencia completa de una cadena sea complementaria de la secuencia de la otra. Las dos hebras presentan distinta polaridad como consecuencia de su orientación antiparalela en sentido opuesto una con respecto a la otra ( $3' \rightarrow 5'$  vs.  $5' \rightarrow 3'$ ), tal y como se representa en la figura 1.4.A. Este alineamiento antiparalelo produce una asociación estable entre las cadenas, que excluye el alineamiento paralelo alternativo. Es importante destacar que en la estructura de doble hélice los grupos fosfato y las moléculas de azúcar están orientadas hacia la zona externa de la misma, mientras que las bases quedan en el interior (figura 1.4.B). Esta característica estructural aporta dos propiedades a la doble hélice de DNA: adquiere un marcado carácter aniónico al situar las cargas negativas aportadas por los fosfatos en la zona exterior y se generan dos ranuras o surcos, uno más pequeño que el otro (1,2 nm vs. 2,2 nm), confiriendo al DNA huecos de intercalación con distintas propiedades y por los que se puede acceder a las bases nitrogenadas.<sup>6,34</sup>

Estructuralmente se pueden distinguir tres niveles fundamentales en la molécula de DNA. La *estructura primaria* está definida por la secuencia específica de las bases a lo largo de las hebras, cada una de las cuales es complementaria a la otra como consecuencia de la paridad adenina-timina y citosina-guanina. Este nivel recoge la información genética de cualquier ser vivo, dado que tres bases consecutivas forman un gen específico o código a partir del cual se puede generar un aminoácido único y concreto.

Por su parte, la *estructura secundaria* describe la estructura global o conformación de las dos hebras de DNA. En condiciones fisiológicas normales (presencia de elevada humedad) esta estructura es la de doble hélice, también denominada *B-DNA*, en la que las hebras se enrollan hacia la derecha, una en torno a la otra, alrededor de un eje común, concentrando 10 pares de bases por vuelta. La doble hélice muestra una anchura aproximada de 2,0 nm de diámetro y una longitud de 3,4 nm por vuelta. Modificando las condiciones ambientales, se han encontrado otros tipos de estructuras. Cuando la humedad capaz de hidratar la doble hélice es baja, se genera la configuración *A-DNA* con 11 pares de bases por

vuelta y cuya característica principal es que el surco mayor es más estrecho y profundo que en la forma *B-DNA*.

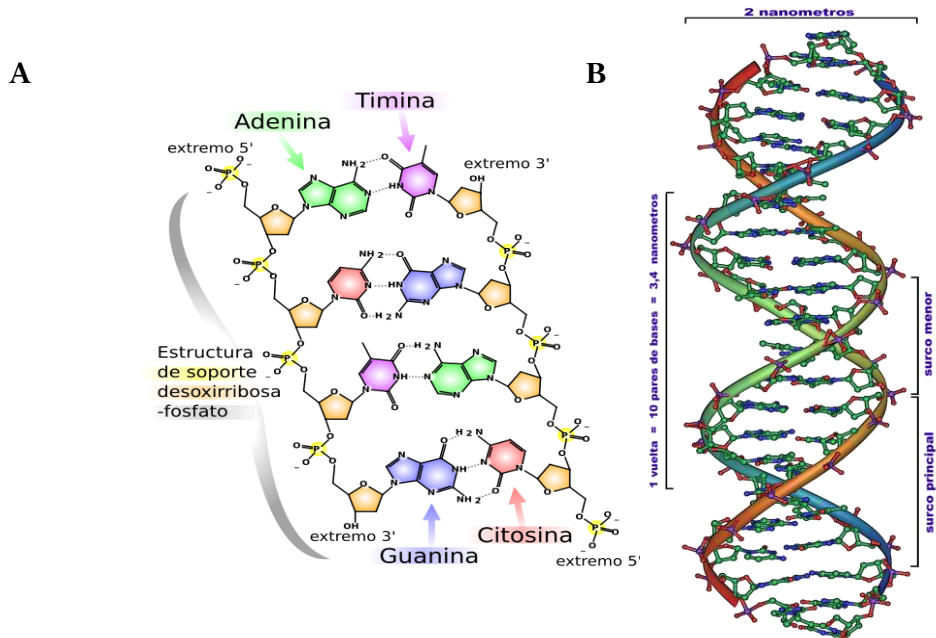


**Figura 1.3.** A) Imagen detallada de la estructura fija de una hebra de DNA, donde se pueden contemplar las uniones fosfodiéster entre el carbono 5' de un nucleótido y el carbono 3' del otro. B) Detalle de las bases purinas y pirimidinas del DNA y los enlaces de hidrógeno que se forman entre ellas uniendo las dos hebras del polinucleótido (dos enlaces en el caso de adenina-timina y tres enlaces en el caso de citosina-guanina). Las líneas sinuosas indican la zona de unión a la desoxirribosa.

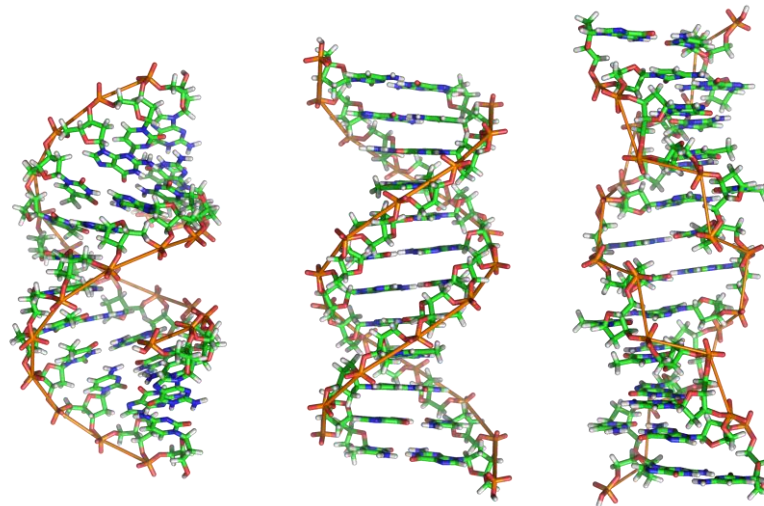
En presencia de elevadas concentraciones catiónicas se ha observado un cambio conformacional en las bases purinas (de *anti* a *sin*) que origina una nueva estructura enrollada a la izquierda denominada *Z-DNA*, con 12 pares de bases por vuelta.<sup>1,6,35</sup> Observaciones recientes indican que el DNA no es una estructura estática, sino que forma otras estructuras inusuales, tales como cruciformes, conformaciones en cadena triple o cuádruple y codos, en determinados lugares de importancia metabólica.<sup>6,36</sup> En la figura 1.5 se muestra la estructura secundaria en sus conformaciones más características.

Finalmente, la *estructura terciaria*, distingue entre formas cíclicas y lineales reflejando los distintos modos que tiene el DNA para empaquetarse. Si bien las moléculas de DNA lineal pueden rotar libremente, este no es el caso del DNA circular. Este último tipo de DNA es el resultado de la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3' y 5' de los polinucleótidos lineales. La doble hélice circular relajada (con la estructura *B-DNA*) puede convertirse en *superhélice* como consecuencia de su superenrollamiento dextrógiro o levógiro; siendo éste último el modo más común encontrado en la naturaleza. Cuando se

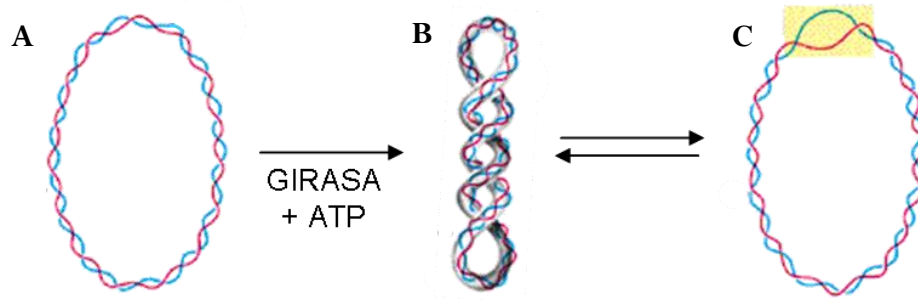
forma el superenrollamiento, la molécula de DNA relajada pasa a estar en tensión por lo que debe realizarse un aporte de energía. Así, como se aprecia en la figura 1.6, el superenrollamiento levógiro (o negativo) actúa de almacenamiento de energía libre, ayudando en aquellos procesos que requieren la separación de las hebras y, por tanto, la formación de regiones monocatenarias biológicamente más activas.<sup>6,36</sup>



**Figura 1.4.** A) Dibujo esquemático de la estructura primaria del DNA en el que se aprecia la orientación antiparalela de las hebras ( $3' \rightarrow 5'$  vs.  $5' \rightarrow 3'$ ). B) Estructura de doble hélice del DNA propuesta por Watson y Crick. Obsérvese los distintos surcos que se generan y la disposición paralela de las bases.



**Figura 1.5.** Estructura secundaria del DNA. De izquierda a derecha: estructuras de A-DNA, B-DNA y Z-DNA.



**Figura 1.6.** Efecto de la tensión sobre una molécula de DNA circular. La acción de la girasa sobre el DNA circular relajado (A) lo convierte en su forma superenrollada negativamente (B). La disminución de la tensión que genera el superenrollamiento revierte en la formación de DNA circular con zonas monocatenarias (C).

El plásmido de DNA, que fue nombrado por el biólogo molecular Joshua Lederberg en 1952, es un conjunto de moléculas de DNA extracromosómico que se replican y transcriben independientemente del DNA cromosómico. Son fáciles de manipular y de insertar nuevas secuencias genéticas en él. Se encuentran presentes en bacterias y a veces en organismos eucariotas como las levaduras. Los plásmidos presentan un tamaño de entre 1 a 250 Kb. Para que se produzca la transfección, el tamaño del plásmido debe ser de 15 MDa, el cual no se rompe ni por agitación, ni por pipeteo, ni por sonicación, es decir, es robusto y compacto.<sup>1</sup> Una de las características que presenta es que puede integrarse por sí sólo en el DNA cromosómico del organismo huésped y se duplica en cada división celular del huésped, por lo cual forma parte de su mapa genético. También contienen un marcador genético que confiere un fenotipo y un polivinculador, es decir, un lugar de clonado múltiple (MCS), donde se encuentran los sitios de restricción que facilitan la inserción de fragmentos de DNA en ese lugar marcado.<sup>37</sup>

Las diferentes conformaciones en las que puede existir el plásmido DNA son:

- *Mellado abierto circular.* Presenta un solo corte filamentario. Es una molécula circular cerrada covalentemente sin superenrollamiento.
- *Lineal.* Es un DNA con terminales libre (cortado por las enzimas de restricción ó porque es lineal originariamente), que presenta roturas en ambas cadenas fosfato en el mismo punto a lo largo del eje helicoidal, formando una molécula lineal.
- *Circular relajado.* Una vez ha sido relajado enzimáticamente, el DNA interacciona con ambos filamentos sin cortar. En esta conformación la molécula circular abierta se la denomina **Forma II DNA**, la cual no contiene superenrollamiento o supergiro de la hélice.

- *Superenrollamiento desnaturalizado (superespiral)*. El DNA está superenrollado pero presenta regiones sin unir, lo que significa que, debido a la excesiva alcalinidad que existe en su preparación, es menos compacto que el superenrollado.
- *Superenrollamiento (superhélice)*. El DNA adopta una estructura superenrollada intacta con filamentos sin cortar, y con forma compacta de remolino. Presenta una estructura circular cerrada dando lugar a un superenrollamiento negativo, cuyas 2 cadenas fosfodiéster permanecen unidas covalentemente. Este plásmido DNA fue denominado **Forma I DNA**.<sup>37</sup> El plásmido DNA circular, superenrollado, mantiene la integridad de la estructura del DNA incluso en la transfección.

### 1.2.2. CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS Y BIOQUÍMICAS

A la estabilidad de la estructura helicoidal del DNA contribuyen una serie de factores. Además de los enlaces de hidrógeno entre las bases A-T y C-G que unen las dos hebras de polinucleótidos, los átomos polares de los azúcares y los fosfatos forman también este tipo de enlaces con las moléculas de agua que rodean al DNA. Diversos enlaces no covalentes aportan también estabilidad energética: interacciones hidrófobas en el interior de la hélice, apilamiento paralelo de las bases mediante fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas en la zona externa entre los fosfatos y cationes divalentes o tetravalentes capaces de disminuir las interacciones repulsivas inter-fosfatos.<sup>36,38</sup> Las características estructurales y químicas del DNA le inducen a interaccionar tanto con pequeñas moléculas o iones metálicos, como con grandes macromoléculas, polímeros y estructuras coloidales, ya sea específica o inespecíficamente. El modo que tiene el DNA para interaccionar con todos ellos puede variar entre electrostáticamente, estéricamente, por interacción hidrofóbica o por enlaces de hidrógeno. Sin embargo no existen apenas fuerzas atractivas de van der Waals entre macromoléculas de DNA.<sup>1</sup> Cabe reseñar que las moléculas de DNA son más estables químicamente que las de RNA, cuya estructura les hace ser más susceptibles a la hidrólisis y a reacciones metabólicas. Aun así, moléculas de DNA de más de  $15 \cdot 10^6$  *uma*, pueden verse dañadas por efecto de la manipulación (pipeteo, mezcla vigorosa, agitación, congelación, etc.), si bien para las secuencias de DNA utilizadas en terapia génica (de menor tamaño), no hay rotura por agitación magnética.<sup>1,39</sup> A concentraciones mayores de  $10^{-6}$  M de bp, el DNA es más estable y exhibe el efecto de autoprotección.

La rigidez de la doble hélice de DNA es relativa, de tal modo que en disolución acuosa muestra parecido con un polímero semi-rígido con forma de rodillo que posee cierta flexibilidad y comportamiento dinámico.<sup>38</sup> Moléculas con <1000 pares de bases presentan

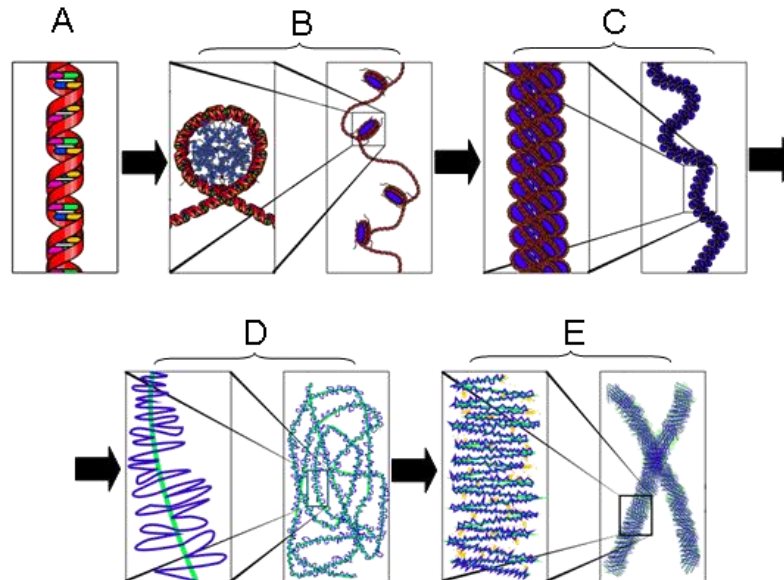


mayor flexibilidad. Esta estructura le permite minimizar la repulsión estérica debida a su completa ionización a pH fisiológico.<sup>1</sup> También es importante destacar que, en disolución acuosa, las moléculas de DNA siempre están hidratadas. Cada nucleótido está asociado con 9 o 10 moléculas de agua en la primera capa de hidratación, formando una espina helicoidal en el surco menor de la doble hélice. El surco mayor no contiene apenas moléculas de agua, dado que los grupos metilo de la timina confieren un carácter hidrofóbico. Los surcos o cavidades mayor y menor de la doble hélice son de gran importancia debido a que afectan a las interacciones y a las propiedades del plásmido DNA circular, superenrollado.<sup>1</sup> Así, cuando se forma el complejo con el DNA, el enlace en el surco menor da lugar a la liberación de moléculas de agua lo que produce un aumento de la entropía, mientras que la unión con el surco mayor es entálpica.<sup>1</sup> Actualmente se cree que las moléculas de agua son parte de la estructura del DNA, pudiendo mediar en distintas interacciones.<sup>1</sup>

Todo organismo vivo posee en el interior de sus células moléculas de DNA. Es aquí donde incide su *vital* importancia, dado que sobre esta macromolécula recae el peso de contener la información biológica necesaria para el correcto desarrollo, funcionamiento y supervivencia del ser vivo. La propiedad que confiere carácter único al DNA de una especie es su secuencia nucleótida, a partir de la cual las células son capaces de transmitir la información a generaciones sucesivas (mediante la replicación) y también de sintetizar las proteínas que requiere el organismo (a través del *RNA* mensajero y de transferencia).<sup>6,35</sup> El ser humano es capaz de generar del orden de  $10^5$  funciones proteínicas diferentes. Esta información genética queda codificada y almacenada en unos  $3 \cdot 10^9$  pares de bases, traducándose en un DNA extendido de aproximadamente 1 m de longitud.<sup>23</sup> Si se tiene en cuenta que el núcleo celular posee un tamaño de entre 5 y 8  $\mu m$  de diámetro, se hace evidente que el DNA debe estar empaquetado de forma muy condensada. Las células eucariotas han encontrado métodos efectivos de condensación por interacción con octámeros de proteínas cargadas positivamente, denominadas histonas, con las que forma nucleosomas. Éstos se empaquetan en fibras de 30 nm de espesor, las cuales a su vez se enrollan sobre sí mismas para formar los cromosomas,<sup>23,24</sup> como aparece esquematizado en la figura 1.7. Además de la condensación natural del DNA con histonas, también se puede llevar a cabo la condensación de manera artificial con polímeros y ciertas estructuras coloidales, tal y como se verá en apartados siguientes.

Por otra parte, el plásmido presenta inestabilidad a los fluidos extracelulares, a la sangre y a la entrada en el medio celular. Por ello se debe complejar con vectores para su protección, evitando su degradación enzimática por el medio extracelular, su degradación por

las DNAsas del medio celular, la alteración de sus propiedades superficiales y por tanto su hidrofobicidad. Además, al complejarse reduce su tamaño asegurando su entrada en la célula. Para conocer si el plásmido se ha protegido y se ha expresado en la célula, codificando la proteína en concreto, existen numerosas técnicas bioquímicas.<sup>1</sup>



**Figura 1.7.** Condensación del DNA en una célula eucariota. La doble hélice de DNA (A) se curva y compacta por interacción con ocho histonas formando los nucleosomas (B). Las histonas H1 generan el empaquetamiento de los nucleosomas formando una fibra de 30 nm de ancho (C). Posterior interacción con proteínas andamio permite conseguir una mayor condensación formando un cromosoma activo durante la interfase (D) o cromosoma metafásico en el momento de la división celular (E).

### 1.3. VECTORIZACIÓN COLOIDAL DEL DNA: LIPOPLEJOS

Los vectores coloidales se presentan como una importante alternativa a los sistemas víricos, al no resultar peligrosos, baja respuesta inmune y elevada capacidad de transporte. El conocimiento de las estructuras, características y propiedades biofísicas de los vectores coloidales es esencial para estudiar los complejos liposoma-DNA, puesto que pueden ayudar a comprender los mecanismos que tienen lugar en su formación y en el proceso de transfección génica. Todo ello se hace muy necesario para estudios de toxicidad, eficacia y futura comercialización de los vectores génicos, de manera que muchas investigaciones se encaminan actualmente en esta dirección. Este apartado aborda brevemente los aspectos más importantes de los sistemas coloidales estudiados en esta Tesis (*liposomas*), y de los complejos que forman al interaccionar, compactar y proteger el DNA (*lipoplejos*).

### 1.3.1. VESÍCULAS Y LIPOSOMAS

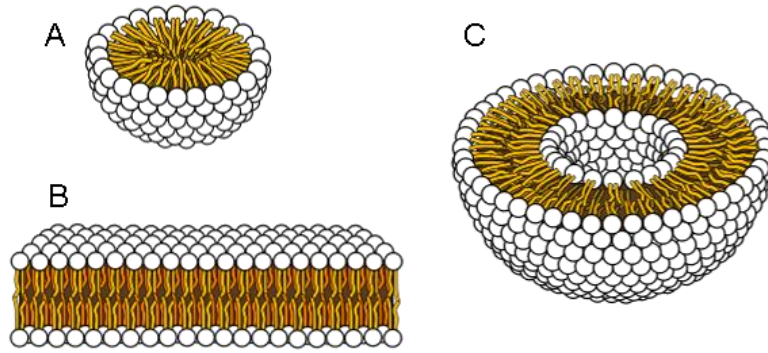
Los surfactantes son moléculas anfifílicas que poseen en su estructura una región polar, iónica o no, de carácter hidrofílico, formada por una o más cabezas polares, y una región apolar hidrofóbica formada generalmente por una o más cadenas hidrocarbonadas alifáticas. Una de las características más significativas de estas moléculas en disolución acuosa es la tendencia, en mayor o menor medida, a adsorberse en la interfase aire-agua, con la parte hidrofóbica lo más alejada posible del medio acuoso, y evitando así la interacción agua-grupo apolar.<sup>40-42</sup> Esta peculiaridad física origina una disminución en la tensión superficial de la disolución que queda reflejada en el nombre genérico de *tensioactivos* que también se les da a estas moléculas.

A bajas concentraciones, la mayoría de los surfactantes son solubles en disolución acuosa y se comportan como electrolitos con un cierto porcentaje de moléculas adsorbidas a la interfase. Cuanto mayor es la hidrofobicidad del surfactante, tanto mayor es la tendencia a acudir a la interfase aire-agua. A medida que aumenta la concentración total, el número de moléculas adsorbidas en la interfase, también se ve incrementada hasta un punto en el que la interfase comienza a saturarse de surfactante. A partir de este punto, si se continúa aumentando la concentración de surfactante, se produce un incremento de la energía libre del sistema debido al número creciente de contactos desfavorables en el seno de la disolución entre las cadenas hidrofóbicas y el agua.<sup>42,43</sup> Con el fin de evitar este aumento de energía libre, los surfactantes comienzan a auto-asociarse en forma de agregados coloidales a una determinada *concentración de agregación crítica (cac)*, característica de cada uno de ellos, mediante un proceso cooperativo conducido por la tendencia de las moléculas de agua a reducir su contacto con las cadenas hidrocarbonadas del surfactante.<sup>42,43</sup> La asociación de las moléculas anfifílicas es de tipo físico, y por esta razón, pueden cambiar el tamaño o la forma de las microestructuras como respuesta a pequeños cambios en concentración, fuerza iónica, temperatura, pH y presión.<sup>1,44,45</sup> En los agregados coloidales directos (en medio acuoso), los grupos hidrofóbicos evitan el contacto con el agua, mientras que los grupos hidrofílicos se localizan en su superficie, interaccionando con el agua y con cierta cantidad de contraiones no disociados. Estos agregados supramoleculares son termodinámicamente estables y están en equilibrio químico dinámico con las moléculas de surfactante libre.<sup>40-42,46</sup>

Si bien la formación de estos agregados se ve favorecida por la supresión de las interacciones desfavorables entre las cadenas hidrófobas y el agua, es de destacar la existencia de interacciones que se oponen a la formación de estos agregados. Entre ellas, las

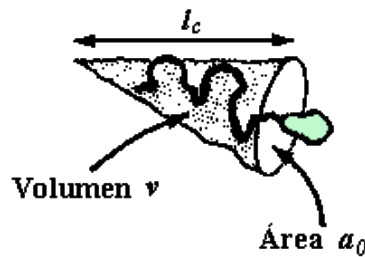
principales son las interacciones electrostáticas repulsivas entre las cabezas polares y las interacciones estéricas que tienen lugar entre ellas y entre las colas hidrófobas.<sup>42,43,47</sup> El balance entre las interacciones repulsivas y las atractivas da lugar a agregados de tamaño finito. La forma de las distintas estructuras coloidales viene determinada por el valor del *parámetro de empaquetamiento*,  $P_e$ , definido por *Israelachvili* en función de las características geométricas del surfactante:<sup>42,44,47,48</sup>

$$P_e = \frac{v}{l_c a_0} \quad (1.1)$$



**Figura 1.8.** Secciones de los diferentes modos de agregación supramolecular más comunes acaecidos en disolución acuosa: A) micela, B) vesícula o liposoma (bicapa curva flexible) y C) bicapa lipídica plana.

donde  $v$  es el volumen de las cadenas hidrocarbonadas, asumiendo que son fluidas e incompresibles,  $l_c$  es la longitud crítica de la cadena hidrocarbonada, es decir, la longitud máxima efectiva que pueden alcanzar las cadenas cuando forman parte del agregado coloidal, y  $a_0$  es el área efectiva que ocupa la cabeza polar en la superficie del agregado (figura 1.9).



**Figura 1.9.** Representación esquemática de los parámetros moleculares de los que depende el parámetro de empaquetamiento,  $P_e$ .

*Tanford* propuso un modelo para estimar el volumen y la longitud de la región apolar en función del número de carbonos de la cadena hidrófoba,  $n_c$ :<sup>43,49,50</sup>

$$v = 0,027 + 0,0269n_c \text{ nm}^3 \quad (1.2)$$

$$l_c = 0,15 + 0,127n_c \text{ nm} \quad (1.3)$$

Típicamente, los surfactantes con parámetros de empaquetamiento de  $1/2 < P_e < 1$  dan lugar a *vesículas* o *liposomas* (bicapas flexibles, figura 1.8.B), como es el caso de los fosfolípidos y surfactantes de doble cadena,<sup>42,44</sup> mientras que para  $P_e \approx 1$  se obtienen bicapas planas (figura 1.8.C). Si bien ambos agregados presentan una estructura similar, representada en la figura 1.8.B, existen diferencias en su composición, tal y como se verá más adelante. En comparación con los de cadena sencilla, los de doble cadena reflejan un aumento en el volumen de la zona hidrófoba que conduce a la agregación supramolecular en forma de vesícula. La baja solubilidad de los monómeros de doble cadena con respecto a los de cadena sencilla (unas  $10^5$  veces menor) hace que la agregación de los surfactantes se produzca a concentración mucho más pequeña, conocida como *concentración vesicular crítica, cvc*.<sup>44</sup>

Dentro de los surfactantes de doble cadena, los lípidos catiónicos gémíni (GemCLs), ampliamente utilizados y estudiados en esta Tesis, están constituidos generalmente por dos cabezas cargadas positivamente de diversa naturaleza, unidas cada una a una cadena hidrofóbica de variada longitud, y entre sí por una cadena espaciadora de variado tipo y longitud. Tanto estos lípidos como los multivalentes<sup>51</sup> (con más de dos cargas positivas), ofrecen la ventaja sobre los CLs convencionales (una carga positiva - dos cadenas hidrofóbicas) de ofrecer una mayor densidad de carga positiva por cadena, y por lo tanto una potencial menor citotoxicidad.

Las vesículas están constituidas por bicapas curvadas y cerradas (de entre 4 y 5 nm de espesor generalmente) en las que las dos superficies polares mantienen contacto con el medio acuoso y protegen a las cadenas hidrofóbicas del mismo,<sup>42,44,52,53</sup> presentando de este modo un compartimento acuoso interno separado de la fase acuosa externa por la bicapa. Esta característica estructural les permite no sólo solubilizar sustancias hidrófobas en el interior de la bicapa, al igual que sucede con las micelas, sino también solubilizar sustancias polares en el compartimento interno, acrecentándose su interés en el campo del transporte o vectorización de fármacos y otro tipo de sustratos polares o apolares.<sup>41,42,53</sup> La diferencia con las micelas no sólo es estructural: a partir de observaciones de la viscosidad de la zona apolar de las vesículas se ha constatado una menor penetración de agua que en el interior micelar.<sup>42</sup> El intercambio monomérico entre las micelas y el medio está limitado por la difusión y ocurre en escalas de micro- o milisegundo, mientras que en las vesículas el proceso está limitado por la baja solubilidad del monómero, llegando a tiempos de relajación de 100 s.<sup>44</sup> Aún más, en las estructuras micelares los surfactantes pueden difundirse en su interior muy rápidamente y hacia cualquier dirección. En las vesículas, por el contrario, existen dos modos

de difusión: el desplazamiento transversal o *flip-flop* en el que el atraviesa la bicapa de un lado a otro de manera lenta, y la difusión lateral, más rápida, entre surfactantes de la misma capa.<sup>42,44</sup>

La composición, así como la distinta naturaleza de las cadenas hidrocarbonadas y regiones polares de los surfactantes, determinan muchas propiedades superficiales y de membrana, tales como la carga superficial, interacciones estéricas o la rigidez de la membrana.<sup>1,41</sup> Esta última propiedad cobra vital importancia a la hora de la preparación de las vesículas, y viene manifestada por la presencia de *mesomorfismo termotrópico*. La existencia de este estado intermedio entre el líquido y el cristal, denominado gel, se demuestra con pequeños cambios estructurales y se produce a una cierta *temperatura de transición de fase termotrópica*,  $T_m$ ,<sup>41</sup> como consecuencia de las diferencias de polaridad existentes en el surfactante. Por debajo de la  $T_m$  los surfactantes en la bicapa (así como una cierta cantidad de moléculas de agua) están altamente ordenados en estado gel, con las cadenas alquílicas en conformación *trans*. Sin embargo, por encima de la  $T_m$  se produce una simultánea disociación del entramado iónico por la entrada de moléculas de agua y la fusión de la región hidrofóbica,<sup>41,42,54</sup> es decir, un aumento del desorden, lo que convierte a la membrana en una estructura más flexible y dinámica. Estudios previos han demostrado que la presencia de surfactantes no iónicos en vesículas mixtas hace disminuir la  $T_m$  de la membrana, todo lo contrario que los surfactantes catiónicos.<sup>55,56</sup>

Las bicapas formadas por moléculas anfifílicas ocupan una posición central en el estudio de sistemas auto-agregados, fundamentalmente porque representan el punto medio entre estructuras normales y estructuras invertidas y porque son la unidad esencial de las membranas biológicas. Multitud de procesos en las células vivas se basan en las propiedades singulares de la bicapa (membrana lipídica), tales como el transporte de iones, ácidos grasos y aminoácidos, la formación de adenosina trifosfato (ATP) y la fotosíntesis.

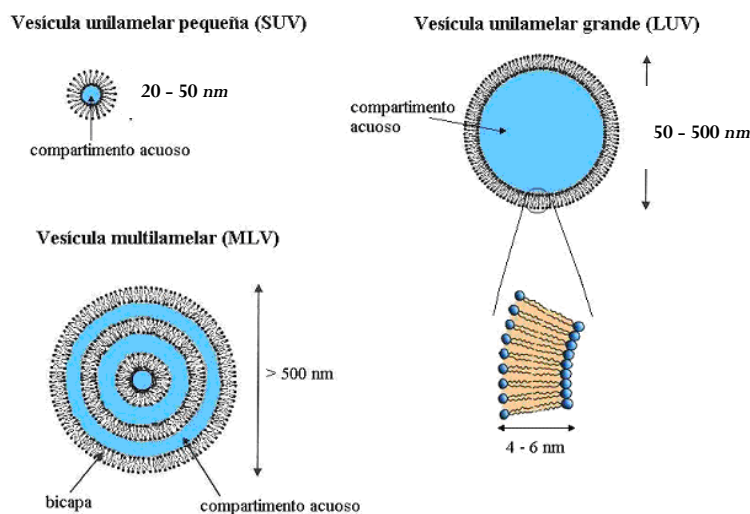
Como se puede apreciar en la figura 1.10, las vesículas/liposomas se clasifican generalmente en función de la morfología o naturaleza y del número de membranas o lamelas:<sup>41,52-54</sup>

- i. SUV: vesículas unilamelares pequeñas de entre 20 y 50 nm de tamaño.
- ii. LUV: vesículas unilamelares grandes comprendidas en un intervalo de tamaños de 50 a 500 nm.
- iii. GUV: vesículas unilamelares gigantes con tamaños superiores a 1  $\mu\text{m}$ .

- iv. LMV: vesículas multilamelares. Su tamaño varía en función del número de bicapas, pudiendo llegar a tamaños superiores a  $10\ \mu\text{m}$ .

De forma general, las vesículas pueden dividirse en dos categorías bien diferenciadas en función de su composición: los *liposomas*, formados por una bicapa de fosfolípidos, ya sean naturales o sintéticos, y las *vesículas no fosfolipídicas*, nombradas comúnmente vesículas.

Las *vesículas no fosfolipídicas* son, como hemos visto, bicapas cerradas que se forman por encima de la *cvc*. Su formación es espontánea y termodinámicamente estable.<sup>57</sup> El tamaño y la polidispersidad de este tipo de vesículas permanecen estables con el tiempo una vez alcanzado el equilibrio, siendo mucho más resistentes a la fusión que los liposomas. De modo general, las vesículas se forman por simple dispersión del surfactante en agua en una concentración por encima de la *cvc*, aunque a posteriori se suele aplicar sonicación a la disolución con el fin de favorecer la formación de vesículas unilamelares bastante uniformes y monodispersas. En cualquier caso, las propiedades de las vesículas son independientes del método de preparación elegido.



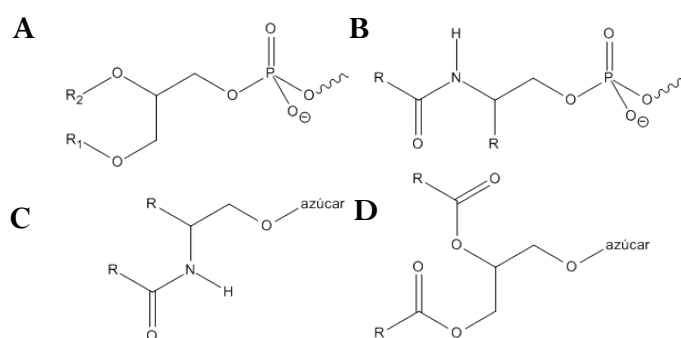
**Figura 1.10.** Estructura y dimensiones de liposomas unilamelares (SUV y LUV) y multilamelares (MLV). (Fuente: M. Jones; D. Chapman. *Micelles, Monolayers and Biomembranes*; John Wiley & Sons: New York, 1995).

Los *liposomas*, sin embargo, están formados por uno o varios tipos de fosfolípidos, pudiendo llegar a contener algún otro componente (surfactantes de doble cadena, colesterol o derivados, glicolípidos, ácidos grasos, proteínas, etc.). La figura 1.11 resume las principales clases de lípidos: glicerofosfolípidos, esfingofosfolípidos, gliceroglicolípidos y esfingoglicolípidos. Los liposomas poseen morfología similar a las vesículas no

fosfolípídicas pero con una baja estabilidad termodinámica.<sup>42,44,47,57</sup> Por este motivo, y a diferencia de las vesículas no fosfolípídicas, se hace necesario un gran aporte energético para su preparación, llegándose a obtener liposomas de muy variada estabilidad y tamaño, en función del método aplicado, aun partiendo de una misma composición. Al desequilibrio termodinámico hay que añadirle la propia inestabilidad química fomentada por la facilidad de los fosfolípidos a oxidarse y degradarse (reacciones de hidrólisis y oxidación lipídica), más aún si cabe en estado hidratado y/o temperatura ambiente, condiciones habituales de experimentación.<sup>1</sup> Todo ello hace del manejo de los liposomas una complicada labor experimental, así como una preparación mucho más prolongada, laboriosa y pautada que en el caso de las vesículas comunes.

Los fosfolípidos zwitteriónicos más comunes en la naturaleza que forman liposomas son las leticinas (fosfatidilcolinas), esfingomielinas y las fosfatidiletanolaminas.

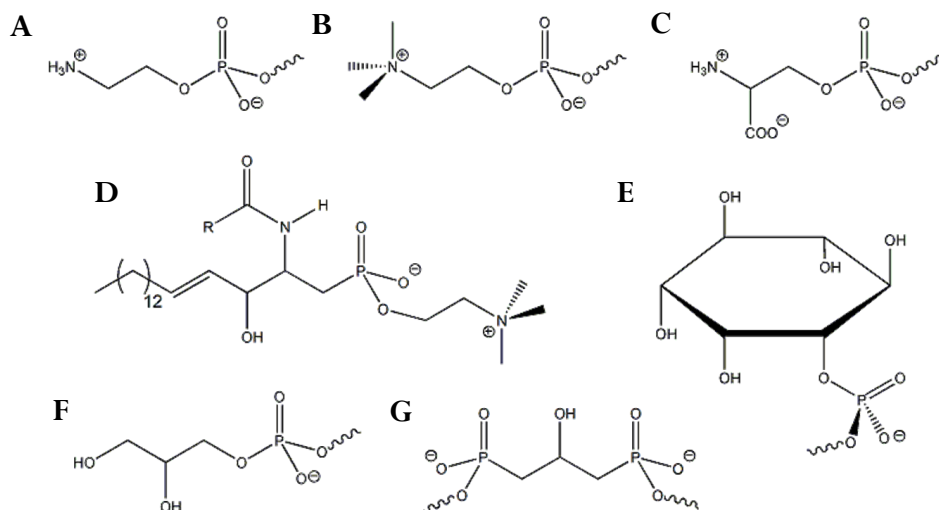
Normalmente se extraen de la yema de huevo, la soja o materia cerebral animal, y son neutros cuando se encuentran a pH fisiológico.<sup>1</sup>



**Figura 1.11.** Principales clases de lípidos: A) glicerofosfolípido, B) esfingofosfolípido, C) esfingoglicolípido y D) gliceroglicolípido. *R* denota cadena hidrocarbonada;  $R_1 = R$  ó  $CO-R$ ;  $R_2 = R$ ,  $CO-R$  ó  $H$ .

En la figura 1.12 se muestra la estructura química de las cabezas polares de algunos de los fosfolípidos más comunes. Los métodos de síntesis actuales de lípidos permiten crear fosfolípidos con cadenas hidrocarbonadas de muy diferentes longitudes, siendo las más usadas: dimiristoil (con  $n_c : n^\circ$  insaturaciones = 14 : 0), dipalmitoil (16:0), diestearoil (18:0), dioleoil (18:1) y palmitoil-oleoil (16:0,18:1).<sup>1</sup>





**Figura 1.12.** Grupos polares de los fosfolípidos más comunes: A) fosfatidiletanolamina, B) fosfatidilcolina, C) fosfatidilserina, D) esfingomielina, E) fosfatidilinositol, F) fosfatidilglicerol y G) difosfatidilglicerol.

### 1.3.2. LIPOPLEJOS

La biocompatibilidad característica de los liposomas, así como su biodegradabilidad y el bajo efecto inmunológico en el organismo, confiere a estos coloides de asociación un elevado interés científico y tecnológico. Investigaciones realizadas a finales de los 80 y principios de los 90 demostraron el potencial de los liposomas catiónicos como sistemas de transporte génico,<sup>58-61</sup> llegándose a obtener prometedores resultados clínicos en humanos.<sup>62</sup> Este método de transfección se basa en la formación de un complejo DNA-liposoma catiónico, denominado *lipoplejo*, capaz de transportar, compactar y proteger el DNA hasta su llegada a la célula. En cuanto al tipo de liposomas, se ha observado que los catiónicos puros (sin la presencia de un lípido coadyuvante) no contribuyen significativamente a la transfección, al contrario que los liposomas catiónicos mixtos (con un lípido coadyuvante), más sensibles a cambios de pH y potencialmente más fusogénicos.<sup>1</sup> La mayoría de los liposomas mixtos estudiados están constituidos por lípidos catiónicos de doble cadena (convencionales o gemini), que confieren al agregado una superficie cargada positivamente capaz de interaccionar electrostáticamente con el DNA,<sup>63</sup> mezclados con fosfolípidos derivados de las fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, o colesterol. Es destacable la frecuente utilización de la 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), cuya elección se debe a la reducción de la citotoxicidad proveniente por el lípido catiónico,<sup>63,64</sup> así como a su capacidad para fusionarse con la membrana plasmática (lípido fusogénico) aumentando los niveles de transporte de DNA y de transfección.<sup>63-67</sup> En general es el lípido coadyuvante más comúnmente utilizado. Ciertos estudios han demostrado además que este fosfolípido facilita

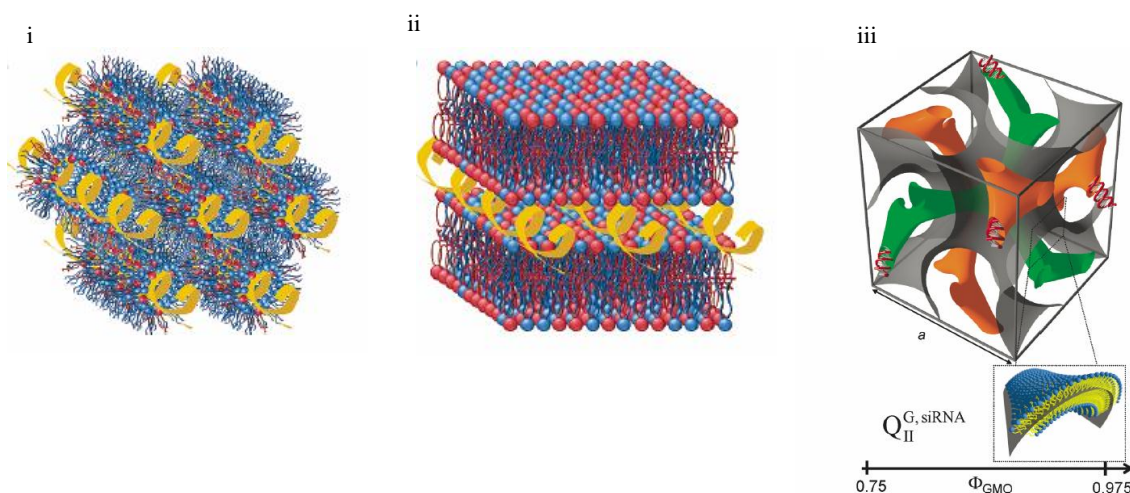
la liberación de contraiones de la superficie lipídica por el acercamiento del DNA<sup>56,68-70</sup> y disminuye la hidratación lipídica.<sup>70,71</sup> En cualquier caso, un reemplazamiento de uno de los componentes lipídicos es suficiente para originar un sustancial cambio en la estructura final del lipoplejo así como de la actividad transfectiva.<sup>63,72</sup> El DOPE, además, disminuye la temperatura de transición gel-fluido de la mezcla lipídica hasta temperaturas próximas a la temperatura ambiente.<sup>56</sup> Se consigue así un aumento en la fluidez de la membrana lipídica del liposoma catiónico, con la consiguiente facilidad de manejo.

La vasta información de que se dispone en la bibliografía acerca del fenómeno de compactación coloidal del DNA pone de manifiesto que la formación de los lipoplejos constituye un fenómeno de origen tanto termodinámico como cinético que da lugar a una gran distribución de formas y tamaños.<sup>1,73-75</sup> Se trata de una interacción esencialmente electrostática pero entrópicamente dirigida, es decir, el incremento entrópico originado por la liberación de contraiones provenientes del lípido catiónico y del DNA<sup>75</sup> es la fuerza conductora de la asociación liposoma-DNA. Así, la atracción electrostática entre ambos da como resultado un agregado mesoscópico cuya estabilidad y cinética de agregación dependerán, entre otros parámetros, de la composición del liposoma, composición del lipoplejo, carga neta del mismo, fuerza iónica del medio, etc. En el caso del DNA, sus cargas negativas (grupos fosfatos) se encuentran neutralizadas por contraiones, de modo que cuando se añaden liposomas catiónicos, sus grupos cargados positivamente tienden a neutralizar por completo la carga del DNA. Para ello los lípidos catiónicos de los liposomas no sólo neutralizan los grupos fosfatos del DNA que quedaban “libres” sino que además reemplazan a una parte de los contraiones que inicialmente neutralizaban la mayor parte de la carga del DNA. Paralelamente, los contraiones de los lípidos de los liposomas también son reemplazados por las cargas del DNA de manera que la expulsión de los respectivos contraiones son los que dan origen a la formación del lipoplejo resultante.<sup>75-77</sup> Con ello, en una primera etapa, los segmentos de DNA cubren la superficie de los liposomas catiónicos actuando como contraiones multivalentes que pueden llegar a invertir la carga neta del sistema. En una segunda etapa, las bicapas de fosfolípidos de los liposomas se rompen dando lugar a una estructura multilamelar en la que los segmentos de DNA se alternan con bicapas fosfolipídicas planas de modo que los extremos del complejo (formados por monocapas lipídicas que no están en contacto con el DNA) generan una interacción electrostática de largo alcance responsable de la estabilidad del lipoplejo.<sup>77,78</sup> Estos contraiones de carga positiva se hallan inicialmente próximos a las cargas de los fosfolípidos y a los grupos cargados del DNA de modo que para que el complejo se pueda formar, es necesario que el

sistema experimente un proceso de inversión de carga, ya sea del liposoma o del DNA. Este fenómeno, también conocido como *efecto de sobrecarga*, consiste en la capacidad de un coloide cargado de atraer contraiones hasta el punto de que la carga neta del sistema sea de signo contrario a la que el coloide poseía originalmente. En la actualidad, aunque existe aún mucha controversia acerca del mecanismo de inversión de carga, sus aplicaciones biomédicas son cada vez más frecuentes.<sup>79</sup>

Desde un punto de vista estructural, se sabe que los lipoplejos pueden presentarse en distintas fases de cristal líquido:

- i) fase hexagonal inversa,  $H_{II}^c$
- ii) fase lamelar,  $L_\alpha$
- iii) fase cúbica,  $V_I$



**Figura 1.13.** Estructuras más aceptadas de los lipoplejos. A) DNA intercalado entre bicapas paralelas de fosfolípidos (fase lamelar,  $L_\alpha$ ). B) DNA en el interior acuoso de micelas cilíndricas inversas de fosfolípidos (fase hexagonal inversa,  $H_{II}^c$ ). C) siRNA intercalado entre bicapas lipídicas formando una fase cúbica de doble giro (Ia3d). (Fuente: C. Leal, N. F. Boussein, K. K. Ewert, and C. R. Safinya, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16841)<sup>80</sup>

La figura presenta un esquema de las tres estructuras. La naturaleza del lípido coadyuvante, y su estructura, a través del parámetro de empaquetamiento, parecen tener una decisiva influencia en el tipo de fase que presente el lipoplejo resultante; así, se ha encontrado que los fosfolípidos de la familia de las fosfatidiletanolaminas (como el DOPE) favorecen las fases hexagonales, mientras que los de la familia de las fosfatidilcolinas (DOPC) favorecen las fases lamelares y los derivados del monoolein glicerol (MOG) favorecen las fases cúbicas.<sup>81</sup> Los estudios bioquímicos de la bibliografía<sup>80,81</sup> apuntan a que

la eficiencia en la transfección del biopolímero a las células sigue el orden: fase cúbica > hexagonal > lamelar.

Desde un punto de vista electroquímico, parece obvio que, siendo una interacción electrostática superficial la responsable del proceso de compactación, la carga neta del lipoplejo tenga un papel protagonista. Efectivamente, se sabe que la relación de cargas (cociente entre las cargas positivas aportadas por los liposomas catiónicos y las negativas aportadas por los pares de bases de DNA) es uno de los parámetros decisivos en el proceso. En la electroneutralidad, esta relación se iguala a 1 y la composición del lipoplejo para la cual aparece es una información clave, ya que marca el límite inferior a partir del cual el lipoplejo es potencialmente adecuado para la transfección celular, ya que presentaría la carga neta positiva necesaria para atravesar la membrana celular.

Tal y como se ha comentado previamente, la estructura y morfología de los lipoplejos dependen de la composición del liposoma mixto (proporción de lípido catiónico y zwitteriónico) y la relación lípido-DNA del lipoplejo o composición del lipoplejo. La primera suele darse en términos de fracción molar de lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ :

$$\alpha = \frac{n_{L^+}}{n_{L^+} + n_{L^0}} = \frac{L^+/M_{L^+}}{L^+/M_{L^+} + L^0/M_{L^0}} \quad (1.4)$$

donde  $n_{L^+}$  y  $n_{L^0}$  son los moles de lípido catiónico y zwitteriónico, respectivamente;  $L^+$  es la masa de lípido catiónico,  $L^0$  es la masa de lípido zwitteriónico y  $M_{L^+}$  y  $M_{L^0}$  son sus pesos moleculares.

Para la composición del lipoplejo se suelen utilizar en la bibliografía dos parámetros adimensionales:

i. *Relación de masas L/D:*

$$\frac{L}{D} = \frac{L^+ + L^0}{D} \quad (1.5)$$

donde  $L$  es la masa total de lípido en disolución y  $D$  es la masa de DNA.

ii. *Relación de cargas,  $\rho$ :*

$$\rho = \frac{n^+}{n^-} = \frac{q_{L^+}^+ L^+/M_{L^+}}{q_{DNA}^- D/M_{bp}} \quad (1.6)$$

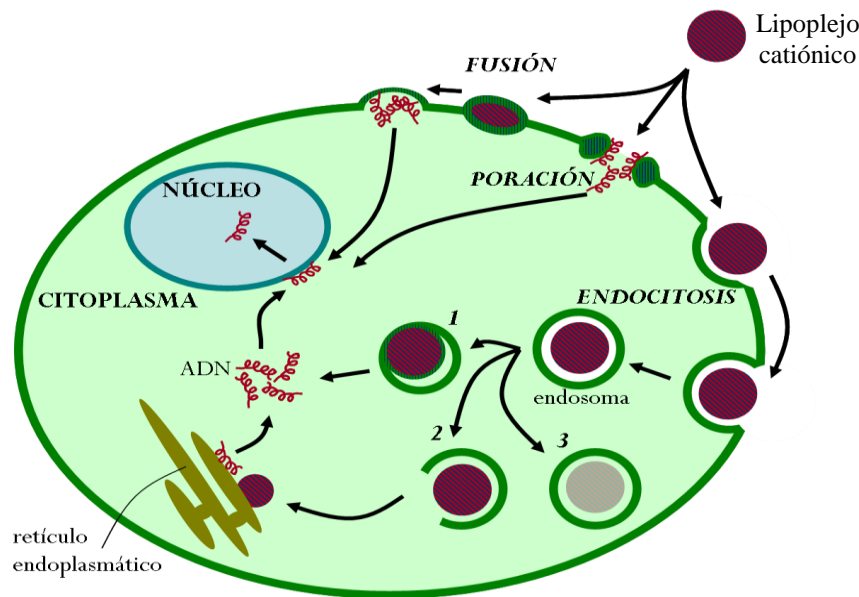
donde  $n^+$  y  $n^-$  son el número de moles de cargas positivas y negativas, respectivamente, y  $M_{bp}$  es el peso molecular promedio del DNA expresado como *g/mol de pares de bases*; y  $q_{L^+}^+$  y  $q_{DNA}^-$  son las cargas del lípido catiónico y el par de bases de DNA, respectivamente.

Esta ecuación es cierta siempre y cuando el lípido zwitteriónico no aporte cargas al sistema, lo que para el DOPE (utilizado en esta Tesis) se consigue a pH fisiológico (pH = 7,4).

Por definición, el valor de  $\rho$  al cual el número de cargas positivas aportadas por el lípido catiónico es igual al número de cargas negativas aportadas por los grupos fosfato del DNA es  $(\rho)_\phi = 1$ . Esta composición se denomina *punto de electroneutralidad* y es de vital importancia dado que los lipoplejos formados a esta  $\rho$  poseen propiedades y estructuras distintas de los complejos formados a  $\rho < 1$  (con carga neta negativa) y a  $\rho > 1$  (con carga neta positiva). Así, a partir de la definición de electroneutralidad y de las ecuaciones 1.5 y 1.6, se puede predecir el valor de relación  $(L/D)_\phi$  al cual ocurre la electroneutralidad, mediante la ecuación:

$$\left(\frac{L}{D}\right)_\phi = \frac{q_{\text{DNA}}^-}{q_{L^+}^+} \frac{\alpha M_{L^+} + (1-\alpha) M_{L^0}}{\alpha M_{bp}} \quad (1.7)$$

Conocer la composición del lipoplejo para la cual se da la electroneutralidad es importante porque para composiciones mayores, i.e.  $\rho > 1$  y/o  $(L/D) > (L/D)_\phi$ , los lipoplejos no sólo protegen el DNA sino que facilitan su transfección en las células. Sin la formación de los mismos, la membrana celular repele al DNA puesto que ambos tienen carga eléctrica negativa. En cambio, el DNA en presencia de los liposomas catiónicos a concentración tal que  $\rho > 1$ , dan lugar a lipoplejos netamente catiónicos que pueden interaccionar con la membrana celular.<sup>27</sup> La polaridad negativa de la membrana celular parece ser clave en el proceso de transfección,<sup>82</sup> pero también se ha demostrado la influencia de otros receptores celulares específicos como proteoglicanos sulfatados,<sup>83,84</sup> glicoproteínas<sup>66</sup> o receptores polianiónicos.<sup>85,86</sup> La introducción del lipoplejo con el DNA en la célula puede seguir varias vías. La figura 1.14 detalla los mecanismos de inserción más destacables; como son la endocitosis, la fusión entre el lipoplejo y la membrana celular, y la translocación a través de la membrana mediada por los lípidos (poración).<sup>1</sup> Quizá el método más común sea el primero de ellos, en el cual la célula engulle al lipoplejo adsorbido o unido a ella, dentro de un *endosoma*.<sup>66,82,87,88</sup> A continuación, éste se fusiona e induce a la digestión de los lípidos y a la liberación del DNA que transporta. En cualquier caso, previo a la internalización del lipoplejo, siempre se produce la adsorción electrostática de los lipoplejos catiónicos a la superficie de la membrana celular cargada negativamente.



**Figura 1.14.** Imagen de los posibles mecanismos de transfección genética con complejos liposoma-DNA (lipoplejos): fusión con la membrana citoplasmática; poración o formación de un poro con lípidos de la membrana y del lipoplejo; y endocitosis en la que el lipoplejo es introducido en el citoplasma por la formación de un endosoma. El endosoma puede seguir tres vías diferentes: fundirse con los lípidos del lipoplejo (1); romperse de manera que el lipoplejo se funda con el retículo endoplasmático (2) o destruirse por degradación lisosómica (3).

Es importante señalar que la fusión de los liposomas con la membrana celular puede originar cierta toxicidad a nivel molecular provocando efectos como la poración, hemólisis, solubilización de los lípidos de membrana, etc. Se hace pues necesario realizar estudios de toxicidad tanto de liposomas como de lipoplejos. En los primeros estudios *in vivo* en animales sobre complejos liposoma-DNA no se llegaron a observar efectos adversos, demostrando baja toxicidad y alta tolerancia al tratamiento.<sup>1</sup> En 1993 se llevó a cabo el primer protocolo de terapia génica *in vivo* en humanos mediante lipoplejos. El DNA utilizado contenía el gen *HLA-B7*, cuya expresión en células cancerosas estimula una respuesta inmune en el paciente para reorganizarlas y destruirlas selectivamente.<sup>27,62,82,89</sup> Éste y otros trabajos relacionados con el mismo gen utilizando lipoplejos han demostrado buena tolerancia, toxicidad leve a nivel local en todos los pacientes, y regresión o desaparición del melanoma en un tercio de la población tratada.<sup>27,82</sup> Desde entonces los lipoplejos se han utilizado en pacientes con enfermedades cancerígenas (tumores de próstata, colon, bronquios, riñón y mama) en estado metastático, estableciendo la viabilidad, la seguridad y el potencial terapéutico del tratamiento.<sup>27,82,90</sup> En todos los casos se ha tratado de pacientes ancianos cuyo sistema inmune podría estar en peligro, con un historial previo terapéutico y con tumores heterogéneos. Teniendo en cuenta estas reservas, es destacable que se ha observado cierta

actividad biológica y antitumoral usando liposomas catiónicos como vectores de DNA.<sup>82</sup> Asimismo, la terapia génica con lipoplejos se ha utilizado para corregir parcialmente deficiencias genéticas tales como la fibrosis quística.<sup>91,92</sup>

Los lipoplejos pueden administrarse por las mismas vías que los liposomas, ampliamente utilizados en farmacología. Estos incluyen distribución sistémica, local (intramuscular, intratumoral, subcutánea, intracerebral, etc.), inyección peritoneal y aplicaciones tópicas.<sup>1</sup> A pesar de las ventajas de la transfección génica utilizando lipoplejos, sobre todo en cuanto a la seguridad se refiere, el principal escollo radica en la baja eficiencia obtenida en animales si se comparan con vectores víricos.<sup>1,27</sup> Nuevas investigaciones en el campo fisicoquímico, como las que constituyen esta Tesis, pueden mejorar o encontrar la estructura, morfología y composición más adecuada con el fin de aumentar la eficiencia de transfección.

Se puede concluir, por tanto, que el fenómeno de compactación coloidal del DNA por nanoagregados coloidales está ampliamente documentado en la bibliografía, tanto desde un punto de vista biofísico como desde el punto de vista bioquímico. En la caracterización biofísica, destaca el uso de las más variadas técnicas experimentales de alta precisión (crio-TEM, TEM, *freeze-fracture*, espectroscopia de fluorescencia, FTIR, DLS, SAXS, potencial  $\zeta$ , conductimetría, tensión superficial, CFM, DSC, etc., por mencionar sólo las más representativas),<sup>75,93-105</sup> así como los métodos de simulación por ordenador (*coarse graining*, DM, MC)<sup>106</sup> y/o modelos semiempíricos y/o teóricos<sup>79,107</sup> (modelo de *agregación-desagregación* o de *condensación y condensación reentrante*, teoría de la renormalización de cargas, etc.).<sup>98,108-110</sup> Por otra parte, están publicados en la bibliografía numerosos estudios bioquímicos (FACS, MTT y microscopía confocal de fluorescencia),<sup>75,76,111-120</sup> dirigidos a evaluar la eficiencia en la transfección del vector coloidal, es decir, su capacidad para compactar el DNA, transportarlo al interior celular (atravesando el torrente circulatorio sin ser degradado por las enzimas), y liberarlo en el citoplasma, para su posterior entrada y expresión en el núcleo celular, codificando un determinado gen de una proteína. Para ello, deben estudiarse los procesos de fusión entre el lipoplejo y la membrana celular, y la reorganización de ésta última tras la interacción. Además, es necesario evaluar la citotoxicidad y la actividad inmune del vector y del lipoplejo, así como el comportamiento de las células y de los lipoplejos en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>65,66,72,82,90,121-125</sup>

Sin embargo, a pesar de este esfuerzo por parte de químicos, físicos y biólogos, lo cierto es que son muchas las preguntas que quedan todavía por contestar en cuanto a la compactación del DNA por nanoestructuras coloidales. Y, por supuesto, sigue sin

solucionarse el escollo más importante: aumentar su eficiencia en los procesos de transfección *in vivo*, para poder finalmente llegar al último objetivo, su uso como vectores terapéuticos de transfección génica en el tratamiento de múltiples enfermedades, sustituyendo, así, a los potencialmente peligrosos vectores víricos.

Probablemente, una de las causas de este aparente “cuello de botella” en esta investigación sea que ha habido cierta descoordinación entre las distintas disciplinas a la hora de abordar estos estudios: los químicos orgánicos se han encargado de sintetizar lípidos, pero no siempre con un plan prediseñado y un objetivo concreto; los químicos físicos han caracterizado los lipoplejos habitualmente en condiciones no fisiológicas y, desde luego, trabajando con DNAs comerciales lineales; y los bioquímicos han llevado a cabo sus ensayos con plásmidos para los que no tenían información previa de cómo se comportaba el lipoplejo correspondiente y de cuáles eran sus parámetros característicos. El problema radica, por tanto, en que la mayor parte de los estudios publicados son independientes y unidisciplinarios; ciertamente, se encuentran en la bibliografía, sobre todo la de hace algunos años, ninguno o muy pocos estudios sistemáticos que aborden la problemática del fenómeno de transfección de material genético al interior celular con este triple planteamiento coordinado de:

- i) síntesis de lípidos biocompatibles, que mejoren las prestaciones de los comerciales,
- ii) caracterización biofísica de los lipoplejos, constituidos por los lípidos sintetizados y plásmidos de DNA, idénticos a los que los bioquímicos utilizan posteriormente en sus experimentos, y no DNAs comerciales lineales, y
- iii) evaluación bioquímica de los lipoplejos caracterizados, analizando finalmente su capacidad de transfección celular y su citotoxicidad.

Y es en este punto donde adquiere especial relevancia la aportación de esta Tesis en este campo, ya que se ha abordado el estudio de los lipoplejos con el triple enfoque antes mencionado. Así, se ha trabajado tanto con lípidos comerciales y DNA lineal de doble hebra comercial, como con lípidos biocompatibles de diseño (sintetizados, por tanto) y un plásmido de DNA, amplificado también en nuestro laboratorio; se han caracterizado los lipoplejos con diversas técnicas, desde un punto de vista electroquímico y estructural, tanto experimental como teóricamente; y finalmente, se ha analizado la potencialidad de los lípidos sintetizados como vectores génicos de DNA mediante su inserción en células *in vitro* (eficiencia en la transfección y baja citotoxicidad). Es destacable que esta Tesis plantea, por primera vez en la bibliografía, que el estudio biofísico y el bioquímico han de llevarse a cabo con el mismo DNA, un plásmido de DNA, único válido para realizar los estudios bioquímicos.



## 1.4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lasic, D. D. *Liposomes in Gene Delivery*; CRC Press: Boca Raton, Florida, **1997**.
- (2) Sturtevant, A. H. *J. Exp. Zool.* **1913**, *14*, 43.
- (3) Griffith, F. *J. Exp. Med.* **1928**, *27*, 113.
- (4) Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty, M. *Journal of the Experimental Medicine* **1944**, *98*, 451.
- (5) Chargaff, E. *Experientia* **1950**, *6*, 201.
- (6) Woodhead, J. L.; Lewis, J. A.; Malcolm, G. N.; Watson, I. D. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *79*, 454.
- (7) *Genes and Disease*; National Library of Medicine, NCBI: Bethesda, **2004**.
- (8) Venter, J. C. *Science* **2001**, *291*, 1304.
- (9) Hungerford, G.; Baptista, A. L. F.; Coutinho, P. J. G.; Castanheira, E. M. S.; Oliveira, M. E. C. D. R. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2006**, *181*, 99.
- (10) Freundlich, H. *Colloid and Capillary Chemistry*; Methuen: London, **1926**.
- (11) Svedberg, T. *Colloid Chemistry*; Chemical Catalog: New York, 1928.
- (12) Einstein, A. *Ann. Physik* **1905**, *17*, 549.
- (13) von Smoluchowski, M. *Zeitschrift für Physikalische Chemie (Munich)* **1918**, *92*, 129.
- (14) Derjaguin, B. V.; Landau, L. *Acta Physicochimica URSS* **1941**, *14*, 633.
- (15) Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. T. G. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*; Elsevier: Amsterdam, **1948**.
- (16) Hartley, G. S. *T. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 31.
- (17) Bangham, A. D. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **1968**, *18*, 29.
- (18) Felgner, P. L.; Heller, M. J.; Lehn, J. M.; Behr, J.-P.; Szoka, F. C. *Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery*; American Chemical Society: Washington, DC, **1996**.
- (19) Eisele, K.; Gropeanu, R. A.; Zehendner, C. M.; Rouhanipour, A.; Ramanathan, A.; Mihov, G.; Koynov, K.; Kuhlmann, C. R. W.; Vasudevan, S. G.; Luhmann, H. J.; Weil, T. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8789.
- (20) Chen, J.; Tian, B.; Yin, X.; Zhang, Y. P.; Hu, D.; Hu, Z.; Liu, M.; Pan, Y.; Zhao, J.; Li, H.; Hou, C.; Wang, J.; Zhang, Y. P. *J. Biotechnology* **2007**, *130*, 107.
- (21) Alatorre-Meda, M.; Gonzalez-Perez, A.; Rodriguez, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7464.
- (22) Moran, M. C.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *Soft Matter* **2011**, *7*, 2001.
- (23) Pose-Vilarnovo, B.; Santana-Penin, L.; Echezarreta-Lopez, M.; Perez-Marcos, M. B.; Vila-Jato, J. L.; Torres-Labandeira, J. J. *S.T.P. Pharma Sci.* **1999**, *9*, 231.
- (24) Griffiths, A. J. F.; Gelbart, W. M.; Miller, J. H.; Lewontin, R. C. *Genética Moderna*; McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.: Madrid, **2000**.
- (25) Verma, I. M.; Somia, N. *Nature* **1997**, *389*, 239.
- (26) Culver, K. W.; Blaese, M. *Trends Gen.* **1994**, *10*, 174.
- (27) Felgner, P. L. *Scientific American* **1997**, *276*, 102.
- (28) Lasic, D. D.; Barenholz, Y. *Handbook of nonmedical applications of liposomes: from gene delivery and diagnostics to ecology*; CRC Press: Boca Raton, Florida, **1996**.
- (29) Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; Parher, S.; Rhodes, G.; Felgner, P.; Dwarki, V.; Gromkowski, S. H.; Deck, R.; DeWitt, C. M.; Friedman, A.; Hawe, L.; Leander, K.; Martinez, D.; Perry, H.; Shilver, J.; Montgomery, D. L.; Liu, M. A. *Science* **1993**, *259*, 1745.
- (30) Yang, J. P.; Huang, L. *Gene Ther.* **1996**, *3*, 549.
- (31) Fraley, R. P.; Subramani, S.; Berg, P.; Papahadjopoulos, D. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10431.
- (32) Fraley, R. P.; Papahadjopoulos, D. *Curr. Topics Microbiol. Immun.* **1981**, *96*, 171.
- (33) Davila-Ibanez, A. B.; Salgueirino, V.; Martinez-Zorzano, V.; Marino-Fernandez, R.; Garcia-Lorenzo, A.; Maceira-Campos, M.; Munoz-Ubeda, M.; Junquera, E.; Aicart, E.; Rivas, J.; Javier Rodriguez-Berrocal, F.; Legido, J. L. *ACS Nano* **2012**, *6*, 747.
- (34) Ewing, M. B.; Trusler, J. P. M. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1106.
- (35) Nelson, G.; Warner, I. M. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 576.

- (36) Devlin, T. M. *Bioquímica. Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas*; Editorial Reverté, S. A.: Barcelona, **2004**.
- (37) Sinden, R. R. *DNA Structure and Function*. Academic Press., **1994**.
- (38) Garrett, R. H.; Grisham, C. M. *Biochemistry*; Harcourt Brace & Co.: Orlando, **1995**.
- (39) Hershey, J. P.; Damesceno, R.; Millero, F. J. *J. Solution Chem.* **1984**, *13*, 825.
- (40) Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science*; Oxford University Press: Oxford, **1986**; Vol. 1.
- (41) Jones, M.; Chapman, D. *Micelles, Monolayers, and Biomembranes*; John Wiley & Sons: New York, **1995**.
- (42) Zana, R. *Dynamics of Surfactant Self-Asssemblies. Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases*; CRC Press: Boca Raton, **2005**.
- (43) Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; Wiley & Sons: New York, **1980**.
- (44) Fennell-Evans, D.; Wennerström, H. *The Colloidal Domain*; John Wiley & Sons: New York, **1999**.
- (45) Attwood, D.; Florence, A. T. *Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology*; Chapman and Hall: London, **1983**.
- (46) Menger, F. M.; Zana, R.; Lindman, B. *J. Chem. Educ.* **1998**, *75*, 115.
- (47) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525.
- (48) Israelachvili, J. *Intermolecular and Surfaces Forces*; Academic Press: London, **1992**.
- (49) Tanford, C. *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 3020.
- (50) Tanford, C. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 2469.
- (51) Ahmad, A.; Evans, H. M.; Ewert, K.; George, C. X.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 739.
- (52) Rosoff, M. *Vesicles*; Marcel Dekker: New York, **1996**.
- (53) Janoff, A. S. *Liposomes: Rational Design*; Marcel Dekker, Inc.: New York, **1999**.
- (54) Fendler, J. H. *Membrane Mimetic Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, **1982**.
- (55) Barreleiro, P. C. A.; Olofsson, G.; Brown, W.; Edwards, K.; Bonassi, N. M.; Feitosa, E. *Langmuir* **2002**, *18*, 1024.
- (56) Feitosa, E.; Alves, F. R.; Niemiec, A.; Real Oliveira, M. E. C. D.; Castanheira, E. M. S.; Baptista, A. L. F. *Langmuir* **2006**, *22*, 3579.
- (57) Zhai, L. M.; Zhang, J. Y.; Shi, Q. X.; Chen, W. J.; Zhao, M. J. *Colloid Interface Sci.* **2005**, *284*, 698.
- (58) Lasic, D. D.; Strey, H.; Stuart, M. C. A.; Podgornik, R.; Frederik, P. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 832.
- (59) Felgner, J. H.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 7413.
- (60) Behr, J. P. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 274.
- (61) Behr, J. P.; Demeemeix, B.; Loeffler, J. P.; Perez-Mutul, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6982.
- (62) Nabel, G. J.; Nabel, E. G.; Yang, Z. Y.; Fox, B. A.; Plautz, G. E.; Gao, X.; Huang, L.; Shu, S.; Gordon, D.; Chang, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11307.
- (63) Gustafsson, J.; Arvidson, G.; Karlsson, G.; Almgren, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 305.
- (64) Litzinger, D. C.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1113*, 201.
- (65) Simões, S.; Slepishkin, V.; Gaspar, R.; de Lima, M. C. P.; Düzgünes, N. *Gene Therapy* **1998**, *5*, 955.
- (66) Hui, S. W.; Langner, M.; Zhao, Y.-L.; Ross, P.; Hurley, E.; Chan, K. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 590.
- (67) Pedroso de Lima, M. C.; Simoes, S.; Pires, P.; Faneca, H.; Duzgunes, N. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 277.
- (68) Zuidam, N. J.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1329*, 211.
- (69) Zuidam, N. J.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1368*, 115.
- (70) Hirsch-Lerner, D.; Zhang, M.; Eliyahu, H.; Ferrari, M. E.; Wheeler, C. J.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1714*, 71.
- (71) Hirsch-Lerner, D.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1370*, 17.
- (72) Xu, Y. H.; Hui, S. W.; Frederik, P.; Szoka, F. C. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 341.

- (73) Dias, R. S.; Lindman, B. *DNA Interaction with Polymers and Surfactants*; Wiley & Sons: Hoboken, **2008**.
- (74) Lonez, C.; Vandenbranden, M.; Ruysschaert, J. M. *Prog. Lipid res.* **2008**, *47*, 340.
- (75) Safinya, C. R.; Ewert, K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Raviv, U.; Needleman, D. J.; Lin, A. J.; Slack, N. L.; George, C.; Samuel, C. E. *Philos. Trans. R. Soc., A* **2006**, *364*, 2573.
- (76) Ewert, K.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Lin, A. J.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 133.
- (77) Muñoz-Úbeda, M.; Misra, S. K.; Barrán-Berdón, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Sierra, M. B.; Biswas, J.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18014.
- (78) Bonincontro, A.; Falivene, M.; La Mesa, C.; Risuleo, G.; Pena, M. R. *Langmuir* **2008**, *24*, 1973.
- (79) Quesada-Perez, M.; Gonzalez-Tovar, E.; Martin-Molina, A.; Lozada-Cassou, M.; Hidalgo-Alvarez, R. *Chem. Phys. Chem.* **2003**, *4*, 234.
- (80) Leal, C.; Bouxsein, N. F.; Ewert, K. K.; Safinya, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16841.
- (81) Leal, C.; Ewert, K. K.; Shirazi, R. S.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R. *Langmuir* **2011**, *27*, 7691.
- (82) Clark, P. R.; Hersh, E. M. *Curr. Opin. Molec. Therapeutics* **1999**, *1*, 158.
- (83) Mounkes, L. C.; Zhong, W.; Cipres-Palacin, G.; Heath, T. D.; Debs, R. J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26164.
- (84) Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12349.
- (85) Nakamura, M.; Davila-Zavala, P.; Tokuda, H.; Takakura, Y.; Hashida, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245*, 235.
- (86) Meyer, K. B.; Thompson, M. M.; Levy, M. Y.; Barren, L. G.; Szoka, F. C. *Gene Ther.* **1995**, *2*, 450.
- (87) Zhou, X. H.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* **1994**, *1189*, 195.
- (88) Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18997.
- (89) Stopeck, A. T.; Hersh, E. M.; Akporiaye, E. T.; Harris, D. T.; Grogan, T.; Unger, E.; Warneke, J.; Schluter, S. F.; Stahl, S. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 341.
- (90) Xu, L.; Pirollo, K. F.; Chang, E. H. *J. Control. Rel.* **2001**, *74*, 115.
- (91) Porteous, D. J.; Dorin, J. R.; McLachlan, G.; DavidsonSmith, H.; Davidson, H.; Stevenson, B. J.; Carothers, A. D.; Wallace, W. A. H.; Moralee, S.; Hoenes, C.; Kallmeyer, G.; Michaelis, U.; Naujoks, K.; Ho, L. P.; Samways, J. M.; Imrie, M.; Greening, A. P.; Innes, J. A. *Gene Therapy* **1997**, *4*, 210.
- (92) Gill, D. R.; Southern, K. W.; Mofford, K. A.; Seddon, T.; Huang, L.; Sorgi, F.; Thomson, A.; MacVinish, L. J.; Ratcliff, R.; Bilton, D.; Lane, D. J.; Littlewood, J. M.; Webb, A. K.; Middleton, P. G.; Colledge, W. H.; Cuthbert, A. W.; Evans, M. J.; Higgins, C. F.; Hyde, S. C. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 199.
- (93) MacDonald, R. C.; Gorbonos, A.; Mornsen, M. M.; Brockman, H. L. *Langmuir* **2006**, *22*, 2770.
- (94) Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Science* **1997**, *275*, 810.
- (95) Rädler, J. O.; Koltover, I.; Jamieson, A.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Langmuir* **1998**, *14*, 4272.
- (96) Rodriguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Llorca, O.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2187.
- (97) Rodriguez-Pulido, A.; Ortega, F.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12555.
- (98) Rodriguez-Pulido, A.; Martin-Molina, A.; Rodriguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648.
- (99) Safinya, C. R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 440.
- (100) Caracciolo, G.; Caminiti, R.; Pozzi, D.; Friello, M.; Boffi, F.; Congiu-Castellano, A. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 222.
- (101) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Amenitsch, H.; Caminiti, R. *Langmuir* **2005**, *21*, 11582.
- (102) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Amici, A.; Amenitsch, H. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 2028.
- (103) Marchini, C.; Pozzi, D.; Montani, M.; Alfonsi, C.; Amici, A.; Amenitsch, H.; De Sanctis, S. C.; Caracciolo, G. *Langmuir* **2010**, *26*, 13867.

- (104) Amenitsch, H.; Caracciolo, G.; Foglia, P.; Fuscoletti, V.; Giansanti, P.; Marianecchi, C.; Pozzi, D.; Lagana, A. *Colloids Surf. B* **2011**, 82, 141.
- (105) Pozzi, D.; Caracciolo, G.; Caminiti, R.; De Sanctis, S. C.; Amenitsch, H.; Marchini, C.; Montani, M.; Amici, A. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2009**, 1, 2237.
- (106) Farago, O.; Gronbech-Jensen, N. *Soft Matter* **2011**, 7, 4302.
- (107) Rodriguez-Pulido, A.; Casado, A.; Munoz-Ubeda, M.; Junquera, E.; Aicart, E. *Langmuir* **2010**, 26, 9378.
- (108) Quesada-Perez, M.; Callejas-Fernandez, J.; Hidalgo-Alvarez, R. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2002**, 95, 295.
- (109) Martín-Molina, A.; Quesada Perez, M.; Galisteo Gonzalez, F.; Hidalgo Alvarez, R. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 6881.
- (110) Martín-Molina, A.; Maroto-Centeno, J. A.; Hidalgo-Alvarez, R.; Quesada-Perez, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, 125.
- (111) Caracciolo, G.; Caminiti, R.; Digman, M. A.; Gratton, E.; Sanchez, S. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 4995.
- (112) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Marchini, C.; Montani, M.; Amici, A.; Amenitsch, H. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 11298.
- (113) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Marchini, C.; Montani, M.; Amenitsch, H. *J. Appl. Phys.* **2008**, 104, 14701.
- (114) Koynova, R.; Tarahovsky, Y. S.; Wang, L.; MacDonald, R. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1768, 375.
- (115) Ahmed, M.; Deng, Z. C.; Liu, S. Y.; Lafrenie, R.; Kumar, A.; Narain, R. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 2169.
- (116) Ewert, K. K.; Evans, H. M.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 877.
- (117) Bajaj, A.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 991.
- (118) Bajaj, A.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1537.
- (119) Bose, S.; Tuunainen, K.; Parry, M.; Medina, O. P.; Mancini, G.; Kinnunen, P. K. J. *Anal. Biochem.* **2004**, 331, 385.
- (120) Reynier, P.; Briane, D.; Coudert, R.; Fadda, G.; Bouchemal, N.; Bissieres, P.; Taillandier, E.; Cao, A. *J. Drug. Target.* **2004**, 12, 25.
- (121) MacDonald, R. C.; Ashley, G. W.; Shida, M. M.; Rakhmanova, V. A.; Tarahovsky, Y. S.; Pantazatos, D. P.; Kennedy, M. T.; Pozharski, E. V.; Baker, K. A.; Jones, R. D.; Rosenzweig, H. S.; Choi, K. L.; Qiu, R.; McIntosh, T. *J. Biophys. J.* **1999**, 77, 2612.
- (122) Fillion, M. C.; Phillips, N. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1329, 345.
- (123) Nicolazzi, C.; Garinot, M.; Mignet, N.; Scherman, D.; Bessodes, M. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 1263.
- (124) Zhdanov, R. I.; Podobed, O. V.; Vlassov, V. V. *Bioelectrochemistry* **2002**, 58, 53.
- (125) Hattori, K.; Ding, W.; Maitani, Y. *J. Control. Rel.* **2007**, 120, 122.



# CAPÍTULO 2

## ***CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA Y BIOQUÍMICA DE LIPOPLEJOS***

*En este capítulo se detallan los compuestos y materiales utilizados, así como los lípidos y el DNA escogidos para analizar su potencial eficiencia en terapia génica. Los protocolos de preparación de los liposomas y de los lipoplejos liposoma-pDNA y liposoma-ctDNA se explican con detalle al final de esta memoria (ver Anexo). Tras esta descripción se presentarán todas las herramientas, tanto experimentales como teóricas, que se han utilizado para la caracterización biofísica y bioquímica de los sistemas coloidales estudiados, describiendo los fundamentos en los que se basa cada técnica o modelo teórico y los instrumentos de medida utilizados para ello.*

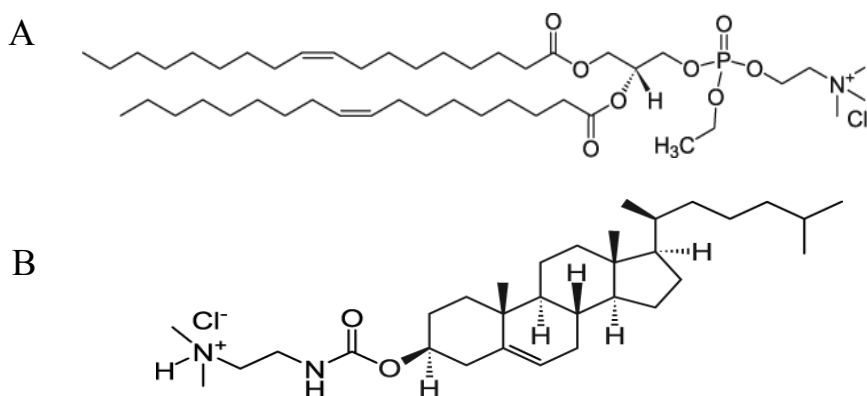


## 2.1. SISTEMAS Y MATERIALES

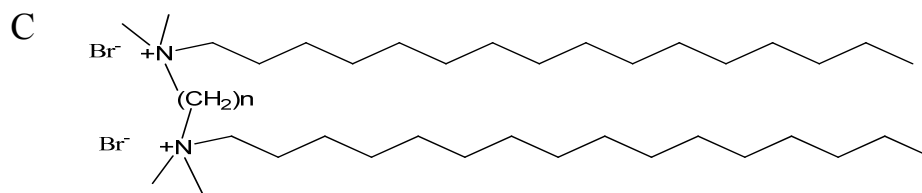
### 2.1.1. LÍPIDOS CATIÓNICOS ( $L^+$ )

Los lípidos con carga positiva que se han utilizado en esta Tesis son:

- *Cloruro de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC)*. Este lípido catiónico tiene una pureza superior al 99 %. Fue adquirido de Avanti Polar Lipids Inc. (EE.UU.), en estado sólido (polvo), pero por su elevado carácter higroscópico se tuvo que disolver en cloroformo, siendo su concentración de 9,296 mg/mL. Su estructura se representa en la figura 2.1.
- *Cloruro de 3-β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]-colesterol (DC-Chol)*. Lípido catiónico derivado del colesterol que posee un conjunto de cicloalcanos en la región hidrofóbica y cuya cabeza polar está formada por el carbamato N-sustituido. Este lípido catiónico fue adquirido de Avanti Polar Lipids Inc. (EE.UU.) en estado sólido (polvo) y tiene una pureza del 98 %. Su estructura se representa en la figura 2.1.
- *Lípidos catiónicos gemini. 1,2-bis(hexadecildimetilamonio)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>*. La estructura que presentan los 4 lípidos catiónicos gemini estudiados es,  $(C_{16}(CH_3)_2A^+)_2C_n$ , siendo  $n = 2, 3, 5$  ó  $12$ , el número de metilenos de una cadena alquílica espaciadora de variada longitud que une las dos cabezas catiónicas de amonio de los lípidos gemini,  $A^+$ , un grupo catiónico amonio que constituye cada una de las dos cabezas polares, y dos cadenas hidrofóbicas saturadas de 16 átomos de carbono, cada una de ellas unida a cada cabeza polar. La estructura se representa en la figura 2.1. Estos lípidos fueron sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica del Prof. S. Bhattacharya, ubicado en el Indian Institute of Science, IISc, en Bangalore (India).<sup>1</sup> Los detalles de esta síntesis se recogen en el Anexo.



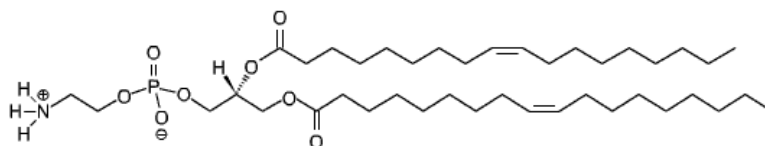




**Figura 2.1.** Estructuras de los lípidos catiónicos: DOEPC (A), DC-Chol (B), Gemini con cabezas polares amonio (C).

### 2.1.2. LÍPIDO ZWITTERIÓNICO ( $L^0$ )

*1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE)*. Suministrado por Avanti Polar Lipids Inc. (EE.UU.), con una pureza del 99 % en estado sólido; debido a su elevado carácter higroscópico tuvo que ser disuelto en cloroformo. El DOPE posee dos cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono cada una, con una insaturación en la posición 9 en configuración *cis* (figura 2.2). Este lípido zwitteriónico se ha utilizado mezclado con los lípidos catiónicos a diferente fracción molar de lípido catiónico formando los liposomas mixtos. A *pH* fisiológico ( $\sim 7,4$ ), el DOPE es eléctricamente neutro. Además, el DOPE es un lípido fusogénico, capaz de fluidificar las bicapas lipídicas en las que participa. Este hecho se debe a su baja temperatura de transición gel-líquido ( $T_m$ ) lo que le permite rebajar la  $T_m$  de la mezcla hasta temperaturas próximas a la temperatura ambiente.<sup>2</sup>



**Figura 2.2.** Estructura del lípido zwitteriónico DOPE.

En la tabla 2.1 se recoge la fórmula y pesos moleculares de los lípidos utilizados, tanto catiónicos como zwitteriónicos. Los lípidos de una sola cabeza polar se han mantenido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mientras que los lípidos gemini sintetizados, se han almacenado a temperatura ambiente.

| LÍPIDO                              | $n = n^\circ$ de átomos de carbono del espaciador | FÓRMULA   | M (g/mol) |
|-------------------------------------|---|---|-----------|
| DOEPC                               | -----   | C <sub>42</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>8</sub> P               | 850,63    |
| DC-Chol                             | -----   | C <sub>41</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P               | 537,27    |
| Gemini con 2 cabezas polares amonio | 2   | C <sub>38</sub> H <sub>82</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>  | 726,88    |
|                                     | 3   | C <sub>39</sub> H <sub>84</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>  | 740,91    |
|                                     | 5   | C <sub>41</sub> H <sub>88</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>  | 768,96    |
|                                     | 12  | C <sub>48</sub> H <sub>102</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> | 867,15    |
| DOPE                                | -----   | C <sub>41</sub> H <sub>64</sub> NO <sub>8</sub> P               | 744,05    |

**Tabla 2.1.** Fórmula y Pesos Moleculares, M, de los lípidos utilizados.

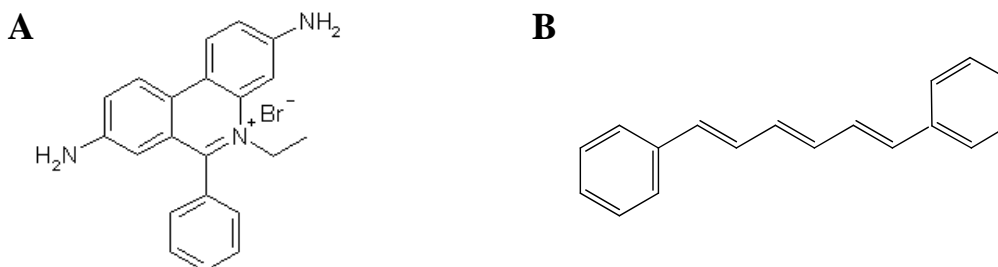
### 2.1.3. ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

Se ha utilizado *ácido desoxirribonucleico liofilizado* procedente del timo de ternero en su forma de sal sódica, suministrado por Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.) con una pureza superior al 95 %, es decir, con menos de 5 % de impurezas proteínicas. Este DNA lineal de 2700 pares de bases (ver Anexo) fue almacenado a 4 °C hasta su utilización, para mantener sus propiedades. Las disoluciones de este DNA lineal se prepararon por pesada 48 horas antes de ser utilizadas.

También se ha utilizado el *plásmido de DNA circular denominado pEGFP-C3*, el cuál a pH fisiológico y dependiendo de la fuerza iónica utilizada, adopta conformación superenrollada. Este plásmido se obtuvo de las células de la bacteria E.Coli, *DH5α*. Su síntesis, caracterización y determinación de sus 4700 pares de bases se detallan en el Anexo. La purificación del plásmido se realizó utilizando el *GenElute HP Select Plasmid Gigaprep Kit* de Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.). Este DNA circular fue almacenado a 4 °C para mantener sus propiedades. Las disoluciones se prepararon por pesada 24 horas antes de ser utilizadas. El plásmido de DNA puede encontrarse, como ya se ha explicado en un apartado anterior de esta memoria, en una de las tres estructuras posibles (circular, superenrollado o formando dímeros), las cuáles se separan en función de su tamaño. La conformación superenrollada es la que presenta menor tamaño en comparación con las otras dos conformaciones, lo que significa que es la que se desplaza más a lo largo del gel agarosa. Por ello, esta conformación es la más eficiente en transfección, puesto que al ser de menor tamaño se internaliza en la célula atravesando la membrana celular con mayor velocidad.

### 2.1.4. SONDAS FLUORESCENTES

*Bromuro de Etidio (EtBr)*. Suministrado por Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.), con una pureza superior al 95 %. Esta sonda es capaz de intercalarse entre los pares de bases del DNA,<sup>3</sup> aumentando notablemente su intensidad de fluorescencia. El máximo de emisión del EtBr intercalado en el DNA se desplaza unos 15 nm hacia el azul en comparación con la fluorescencia emitida en ausencia del biopolímero.<sup>3</sup> Su estructura se muestra en la figura 2.3.A. El EtBr se utiliza para analizar las interacciones entre el DNA y los liposomas mixtos por medio de ensayos de intercalación tanto por espectroscopía de fluorescencia como por electroforesis en gel de agarosa.<sup>4-7</sup> También se ha utilizado la sonda GelRed a una concentración 150x (patente), que se intercala entre los pares de bases del DNA al igual que la sonda EtBr, pero siendo menos cancerígena.



**Figura 2.3.** Estructuras de las sondas fluorescentes: A) Bromuro de Etidio, EtBr, B) 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno, DPH.

*1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH)*. Suministrada por Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.) con una pureza superior al 97,5 %. Esta sonda es una molécula hidrófoba que emite fluorescencia cuando se intercala entre las bicapas lipídicas apolares de los liposomas, y presentan una fluorescencia despreciable cuando está en medio acuoso.<sup>3</sup> Su estructura se muestra en la figura 2.3.B. Dentro de la bicapa del liposoma, el DPH se sitúa en la zona de las cadenas hidrocarbonadas a unos 13 Å del centro de la bicapa. Con esta sonda se puede obtener información acerca de la viscosidad y fluidez de la membrana lipídica, del empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas en la parte más interna de la bicapa,<sup>8-11</sup> y de su temperatura de transición gel-fluido ( $T_m$ ). La longitud de onda a la que se produce la máxima absorción es 365 nm, mientras que la de máxima emisión es 425 nm, lo que implica que presenta dipolos de transición paralelos a su eje longitudinal que provocan una elevada polarización de la fluorescencia cuando no hay movimiento rotacional, y presenta una elevada sensibilidad a la reorientación provocada al interaccionar con otros lípidos del medio.<sup>3,12</sup>

### 2.1.5. OTROS MATERIALES

*Phosphate Buffered saline (PBS)* ( $pK_a = 7,66$ ). Suministrada por Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.). Esta disolución reguladora fue preparada a  $pH \sim 7,4$  a partir de un sólido compuesto de  $0,138\text{ M}$  de NaCl,  $0,0027\text{ M}$  de KCl,  $10\text{ mM}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $2\text{ mM}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  en agua desionizada a una fuerza iónica de  $150\text{ mM}$ .

*Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacina-1-etanolsulfónico (HEPES-H)* ( $pK_a = 7,66$ ) y *4-(2-hidroxietil)-piperacina-1-etanosulfonato sódico (HEPES-Na)*. Ambos reactivos, con purezas superiores a  $99,5\%$  y  $99\%$ , respectivamente, fueron suministrados por Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.). Esta disolución reguladora fue preparada a  $pH$  fisiológico ( $\sim 7,4$ ).

### 2.1.6. SISTEMAS ESTUDIADOS: LIPOPLEJOS

En esta Tesis Doctoral se han caracterizado biofísica y biológicamente una serie de lipoplejos, formados por la interacción del DNA con los liposomas mixtos, estando estos últimos constituidos por un lípido catiónico y otro zwitteriónico a varias composiciones molares.

- *DOEPC/DOPE-DNA*:<sup>13</sup> El lípido catiónico, DOEPC, posee una cabeza polar y dos cadenas hidrofóbicas de 18 átomos de carbono, insaturadas en la posición 9, lo que le confiere una mayor fluidez a su bicapa lipídica. Por ello es un agente de transfección muy utilizado en terapia génica. Este lipoplejo no sólo se ha caracterizado biofísicamente con DNA lineal (ctDNA), sino también con un plásmido de DNA (pDNA). Se eligió este liposoma mixto para analizar y predecir los principales factores que afectan el proceso de compactación de DNA, así como para determinar las características de los lipoplejos resultantes junto con su potencial uso en terapia génica.
- *DC-Chol/DOPE-DNA*:<sup>14</sup> El lípido catiónico, DC-Chol, derivado del colesterol, ha sido estudiado con el fin de analizar las diferencias en sus propiedades biofísicas y en su morfología en función de la fracción molar de lípido catiónico,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, en comparación con otros lípidos catiónicos. Los lipoplejos estudiados han sido los formados por este liposoma mixto al compactar el DNA lineal o el plásmido de DNA.
- *Sistemas Gemini/DOPE-pDNA*: Se ha estudiado el sistema gemini que presenta dos cabezas polares amonio, a diferentes longitudes de espaciador,  $n$ . Estos liposomas catiónicos han sido utilizados para realizar un estudio biofísico y bioquímico que ha permitido determinar su eficiencia en la transfección del plásmido DNA.<sup>1,15,16</sup>

## 2.2. PREPARACIÓN DE LOS LIPOSOMAS Y LIPOPLEJOS

Partiendo del método experimental para la preparación de liposomas<sup>17</sup> descrito por Lasic, y el protocolo desarrollado y optimizado en nuestro laboratorio,<sup>18</sup> los liposomas se han preparado de la siguiente manera:<sup>18-20</sup>

- i. Primero se debe formar la mezcla liposómica, constituida por un lípido catiónico y el lípido zwitteriónico, en una fase orgánica (cloroformo), para asegurar la óptima homogeneización de ambos lípidos. Posteriormente se realiza un secado (evaporación del disolvente) con el fin de formar una película delgada adherida a las paredes del vial.
- ii. A continuación se lleva a cabo la hidratación en la disolución tamponada, mediante agitación vigorosa y sonicación (no más de 20 *min*, para evitar la aparición de vesículas unilamelares de pequeño tamaño (*SUVs*) con una elevada polidispersidad). Para favorecer la hidratación, es recomendable mantener la temperatura por encima de la temperatura de transición gel-fluido,  $T_m$ , y así evitar la posible rigidez de las membranas. Durante esta etapa se generan vesículas multilamelares (*LMVs*).
- iii. Por último, se realiza la extrusión con el fin de asegurar la homogeneidad de tamaño en la población de liposomas, reducir el tamaño de las *LMV* y el número de lamelas. Todo ello se realiza en diferentes períodos de sonicación, extrusión y homogeneización, respectivamente. La *extrusión* consiste en forzar neumática o mecánicamente a los liposomas a atravesar una membrana o filtro con un tamaño de poro determinado. Gracias a la extrusión se forman *LUVs* con diámetros algo superiores al tamaño de poro y con una polidispersidad muy pequeña. Es sin duda el método con el que se consiguen liposomas más homogéneos, y por ello es el más utilizado.

### 2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS PELÍCULAS LIPÍDICAS

Inicialmente se pesan los lípidos que van a formar la mezcla liposómica, para la cual se deben tener en cuenta dos factores:

1. La relación entre la masa de liposoma total ( $L = L^+ + L^0$ ) y la masa de DNA presentes en la disolución de lipoplejo final, ( $L/D$ ), que se pretende alcanzar considerando que la concentración de DNA permanece constante y que sólo varía la cantidad de liposoma mixto utilizado. El valor de concentración de DNA dependerá del liposoma mixto estudiado y de la técnica utilizada.
2. La composición molar,  $\alpha$ , entre los lípidos catiónico,  $[L^+]$ , y zwitteriónico,  $[L^0]$ , que se ha elegido entre  $\alpha = 0,15$  y 1 en función del tipo de liposoma mixto estudiado.

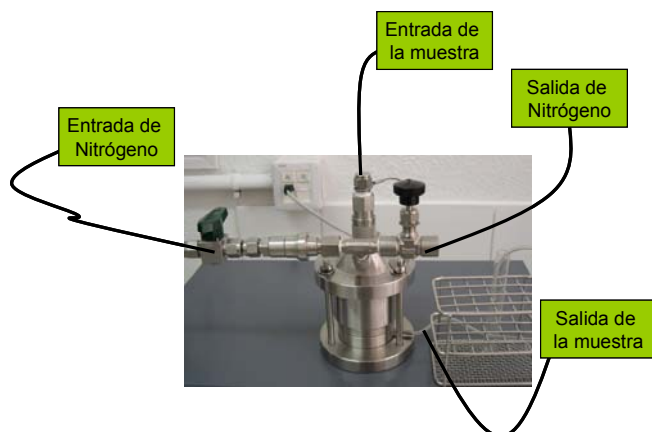
A continuación se adiciona un pequeño volumen de cloroformo para asegurar la disolución de los mismos. Después de mezclar la disolución que contiene los lípidos con agitación intensa en un *Vortex-Genie 2* (Scientific Industries Inc. EE.UU), se elimina el disolvente orgánico por evaporación a vacío con un *evaporador-centrífuga Jouan RC10.09* (Société Jouan, Francia) a 1200 *rpm* y a  $5 \cdot 10^{-4}$  *atm*, con lo que en las paredes del vial se forman capas o películas secas muy finas que contienen la mezcla lipídica. A pesar de que con este proceso prácticamente todo el disolvente es eliminado, las trazas ocluidas entre las películas se eliminan posteriormente con un desecador a vacío durante al menos 1 *hora* (el número de horas dependerá de la cantidad de films que se están preparando). Finalizada esta última etapa, las películas formadas, libres de cloroformo, se conservan a - 80 °C. Este método de almacenaje permite mantener las propiedades del liposoma íntegras y evitar la oxidación lipídica hasta su utilización.

### **2.2.2. HIDRATACIÓN, REDUCCIÓN Y HOMOGENEIZACIÓN**

La hidratación de las películas se ha realizado con una disolución reguladora salina de fosfatos (PBS 150 *mM*), para el DOEPC, y con la disolución reguladora HEPES (40 *mM*) para el resto de sistemas estudiados. El *pH* de la disolución tampón fue medido a 25 °C utilizando un potenciómetro *Metrohm 713* (Metrohm Ltd., Suiza). Se adicionó un determinado volumen de disolución reguladora a las películas y para favorecer la hidratación, el hinchado, y la formación de los liposomas se les aplicó de manera alternante agitación vigorosa con el *vortex*, y pequeños períodos de sonicación. Para evitar la formación de *SUV*,<sup>21</sup> la suma de esos períodos de sonicación no superó nunca los 20 *min*. A pesar de que se redujo la temperatura de transición gel-fluido a valores por encima de la temperatura ambiente, estas disoluciones liposómicas se calentaron al baño maría a 60 °C para favorecer su hidratación y homogeneización.<sup>2</sup>

Con la aplicación de estos tres métodos (*vortex*, ultrasonidos y calor) durante un tiempo que osciló entre 5 y 24 *horas*, se obtiene una población de liposomas esencialmente unilamelares, de gran tamaño (*LUV*) y bastante polidispersos.<sup>22,23</sup> Dado que los liposomas unilamelares pequeños poseen mayor sensibilidad frente a la reestructuración de las membranas durante la formación de los lipoplejos,<sup>17</sup> se aplicó la extrusión como técnica de reducción de tamaño y homogeneización de los liposomas, utilizando el extrusor *Thermobarrel Lipex Extruder* (Nothern Lipids Inc., Canadá) (figura 2.4), de una capacidad de hasta 10 *mL*, conectado a una botella de nitrógeno gas. Este dispositivo permite aumentar la presión en el interior del cilindro metálico, donde se encuentra la disolución de

liposomas mixtos, de manera que el nitrógeno empuja la disolución, la cuál atraviesa la membrana de un determinado tamaño de poro. Para una óptima extrusión se realizó una *extrusión secuencial*, de modo que la disolución liposómica se pasó de manera sucesiva a través de una membrana de 400 nm de diámetro de poro (5 veces), de 200 nm (otras 5 veces), y de 100 nm (10 veces), consiguiendo de este modo liposomas unilamelares (LUV) de baja polidispersidad, con tamaños en torno a 100 nm.



**Figura 2.4.** Extrusor Thermobarrel Lipex Extruder.

Por otra parte, se prepararon las disoluciones de DNA (ctDNA o pDNA) en HEPES 40 mM a concentraciones de 0,1 mg/mL para las medidas de potencial zeta, espectroscopía de fluorescencia, electroforesis en gel de agarosa y las técnicas biológicas; 0,1 ó 2 mg/mL para las medidas de crio-TEM; y 5 mg/mL para determinar las estructuras de los lipoplejos con la técnica de SAXS. Estas disoluciones se guardaron a temperatura ambiente las primeras 24 horas, a 4 °C las siguientes 24 horas y a -30 °C durante largos períodos de tiempo para mantener sus propiedades y evitar posibles descomposiciones.

Por último, los lipoplejos se formaron al mezclar la disolución de liposomas mixtos, previamente preparada, con la disolución de DNA (ctDNA o pDNA), siguiendo el protocolo ya descrito y utilizado en nuestro laboratorio,<sup>18,19</sup> donde se describieron y optimizaron: el orden de adición (mismo volumen de disolución de DNA sobre mismo volumen de disolución de liposomas mixtos);<sup>5,24</sup> el modo de adición (gota a gota por medio de una microjeringa *Hamilton* para garantizar la óptima formación del lipoplejo); la velocidad de adición (0,2 mL/min); la agitación durante el mezclado (vigorosa y constante); y el tiempo de agitación necesario para formar los lipoplejos antes de proceder a su caracterización (10 min).

## 2.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

En este apartado se presentan muy brevemente las técnicas experimentales fisicoquímicas y bioquímicas utilizadas en esta Tesis. Se puede distinguir dos grandes grupos: *técnicas de caracterización* de los liposomas estudiados en ausencia y en presencia de DNA, y *técnicas de evaluación* de su eficiencia como vectores coloidales de DNA en terapia génica. Las técnicas experimentales utilizadas se clasifican de la siguiente manera:

1. Técnicas Electroquímicas.
  - a. *Movilidad Electroforética y Potencial Zeta*
  - b. *Electroforesis en Gel de Agarosa*
2. Técnicas espectroscópicas. *Espectroscopía de fluorescencia (ensayos de intercalación de sondas y medida de anisotropía de fluorescencia)*
3. Técnicas de Microscopía.
  - a. *Crio-Microscopía Electrónica de Transmisión (crio-TEM)*
  - b. *Microscopía Confocal de fluorescencia*
4. Técnicas de Dispersión. *Dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS)*
5. Técnicas de medida de Eficiencia en la Transfección. *Flow Assisted Cell Sorting o Citometría de Flujo (FACS)*
6. Técnicas de medida de citotoxicidad (% viabilidad celular). *Ensayo de reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT)*

### 2.3.1. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA Y POTENCIAL ZETA

Posiblemente sea la técnica clave de esta Tesis puesto que informa acerca de la carga superficial de liposomas y lipoplejos en disolución. Permite determinar con elevada precisión la composición del lipoplejo para la cuál es eléctricamente neutro (electroneutralidad) y por tanto, define el límite inferior a partir del cuál la carga neta del sistema es positiva y el lipoplejo se convierte en un vector potencialmente eficaz en transfección celular. Por consiguiente, suministra una información imprescindible para saber el intervalo de composiciones de los liposomas mixtos y las concentraciones de los lipoplejos que interesa preparar para evaluar la eficiencia de los lípidos catiónicos estudiados como vectores coloidales del DNA.

Habitualmente, el potencial zeta,  $\zeta$ , de los liposomas y lipoplejos se obtiene a partir de medidas experimentales de movilidad electroforética,  $\mu_e$ , de estas partículas cargadas cuando se mueven en el seno de un campo eléctrico,<sup>25,26</sup> según la ecuación:



$$\zeta = \frac{3\eta}{2\varepsilon_r\varepsilon_0 f(\kappa_D a)} \mu_e \quad (2.1)$$

donde  $\varepsilon_0$  y  $\varepsilon_r$  son las permitividades en el vacío y relativa, respectivamente,  $\eta$  es la viscosidad del disolvente, y  $f(\kappa_D a)$  la función de Henry, que combina el tamaño de la partícula coloidal,  $a$ , con el espesor de la atmósfera iónica o longitud de Debye,  $1/\kappa_D$ , dada por la ecuación:

$$\frac{1}{\kappa_D} = \left( \varepsilon_r \varepsilon_0 kT / \sum_{i=1}^{N_i} e^2 z_i^2 n_i \right)^{1/2} \quad (2.2)$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura,  $z_i$  es la valencia de los  $N_i$  iones presentes en la disolución a una concentración  $n_i$  y  $e$  es la carga del electrón.

Cuando el tamaño de las partículas es muy superior al espesor de la interfase electrificada que las rodea ( $\kappa_D a \gg 1$  o  $a \gg \kappa_D^{-1}$ ), como es el caso de los liposomas y lipoplejos estudiados en esta Tesis, se puede aproximar la función de Henry a un valor límite,  $f(\kappa_D a) = 1.5$ . Es la conocida *aproximación de Smoluchowski o de la doble capa fina*,<sup>27,28</sup> según la cuál la ecuación 2.1 se simplifica:

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \mu_e \quad (2.3)$$

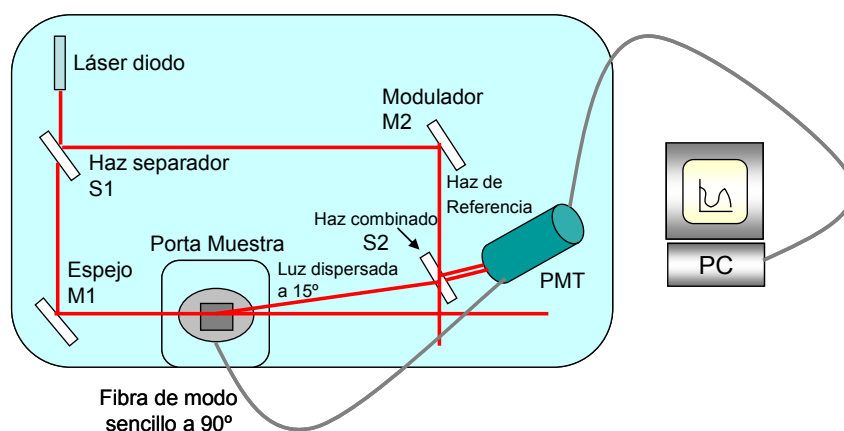
Asimismo, la técnica utilizada en este trabajo también permite determinar el tamaño medio de los liposomas, a partir de medidas de dispersión de luz a ángulo fijo (15°).

El equipo utilizado, un *Zeta PALS (Zeta Potencial Analyzer)* (BIC Brookhaven Instrum. Cor. (EE.UU.)), ha sido puesto a punto en esta Tesis. A diferencia del método de Electroforesis Láser Doppler (LDE), utilizado con anterioridad en nuestro grupo, la tecnología PALS se basa en un método interferométrico que no requiere grandes campos para medir la movilidad electroforética, evitando los efectos térmicos. Tal y como se muestra en la figura 2.5, el *Zeta Potencial Analyzer* está constituido por los siguientes componentes:

- a) *Láser de Wolframio* que emite a 659 nm y que incide sobre la muestra con una potencia máxima de 35 mW.
- b) *Célula electroforética*, fabricada en plástico y con un volumen de 1,5 mL.
- c) *Dos electrodos de paladio* a través de los cuáles se aplica una diferencia de potencial máxima de 100 V, originando el movimiento de las partículas

coloidales cargadas superficialmente. Tanto la célula como los electrodos están tapados por una cubierta térmica.

- d) *Controlador de temperatura Peltier*: con una precisión de  $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantiene la temperatura de la célula electroforética constante.
- e) *Modulador*.
- f) *Detector de fotodiodos de avalancha APD-Hamamatsu*: detecta cada fotón y transforma la señal en unidad de conteo (*fotones/s*).
- g) *Correlador digital*.
- h) Ordenador conectado al equipo mediante un *puerto de serie RS-232C*.



**Figura 2.5.** Esquema del equipo ZetaPALS.

Tanto el manejo del equipo como el almacenamiento de los datos, se realiza de forma automática. En términos generales, para cada muestra se tomaron 50 medidas experimentales. Previamente, se llevó a cabo un calibrado con un patrón de potencial zeta conocido, ( $50 \pm 5\text{ mV}$ ).

### 2.3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se trata de una técnica de separación y caracterización que se basa esencialmente en la migración de moléculas con carga neta de una muestra, cuando ésta es sometida a un campo eléctrico, hacia el polo opuesto de su carga. Hay dos fuerzas que determinan la velocidad con que una molécula migra: la fuerza eléctrica y la de rozamiento. La primera es la responsable de que la molécula en cuestión sea atraída hacia uno de los electrodos; cuanto mayor sea el cociente carga/masa de la molécula, mayor será la aceleración con que se mueva. Sin embargo, la fuerza de rozamiento, que depende del tamaño y forma de la molécula que migra y de las características del medio en que se mueve (fuerza iónica,

viscosidad y temperatura), tiene una acción opuesta: a mayor rozamiento, menor velocidad de migración. Por tanto, la velocidad de migración,  $v$ , es directamente proporcional a la intensidad del campo eléctrico,  $E$ , y a la carga neta,  $q_n$ , e inversamente proporcional al coeficiente de fricción,  $f$ , que recoge todos los efectos del medio:

$$v = \frac{q_n E}{f} \quad (2.4)$$

De esta forma, una muestra polidispersa puede separarse en las distintas moléculas que la constituyen, con formas y pesos moleculares diferentes. Para que la separación sea eficiente, se debe utilizar un medio de migración adecuado, que suministre una fuerza de rozamiento suficiente. Para ello, se trabaja habitualmente con un gel que consiste en un polímero orgánico entrecruzado (por ejemplo, agarosa, derivado de un polisacárido de un alga) y que aumenta considerablemente la fricción, impidiendo a la vez la difusión de las moléculas a través del medio acuoso en todas las direcciones. Asimismo, es necesario utilizar una sonda fluorescente inmersa en el soporte electroforético junto con el gel, para que su emisión a una determinada longitud de onda permita analizar finalmente, con la ayuda de una lámpara UV, las bandas correspondientes a las distintas moléculas en que se ha separado la muestra original.

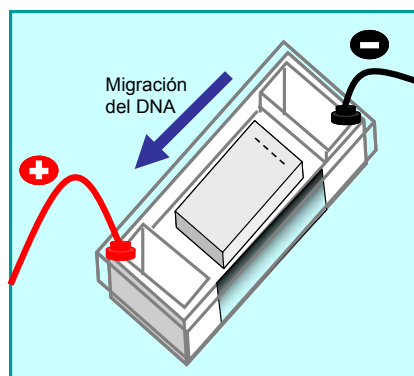
La *electroforesis en gel de agarosa* es ampliamente utilizada para analizar y caracterizar ácidos nucleicos y proteínas, siendo una herramienta analítica simple, rápida y sensible. En el caso de DNA de doble cadena, como la carga neta está dada por los grupos fosfatos, hay un fosfato cargado negativamente por cada nucleótido y la masa de los cuatro desoxirribonucleótidos es similar, se puede afirmar que el cociente carga/masa es independiente de la secuencia y la longitud de la doble cadena de DNA (todas las moléculas de DNA migrarán entonces hacia el ánodo). Ello quiere decir que las diferencias en la migración no vienen determinadas por la fuerza eléctrica, sino que están dadas exclusivamente por la fuerza de rozamiento. Como los fragmentos de DNA migran en el mismo medio y todos tienen la misma forma, la velocidad de migración tiene que ver únicamente con su tamaño (la longitud de la doble cadena, medida en pares de bases).<sup>29,30</sup> En el caso de plásmidos, es la fuerza iónica del medio la que determina su conformación, más o menos enrollada, siendo su velocidad de migración siempre menor que la del DNA de doble hebra lineal. Cuando se utiliza la técnica para caracterizar ácidos nucleicos, habitualmente se escoge el bromuro de etidio como sonda fluorescente, puesto que su emisión experimenta un apreciable aumento (aumenta el rendimiento cuántico de

fluorescencia) cuando se intercala entre los pares de bases del DNA, que le proporcionan un entorno hidrofóbico protector. Una vez separados los fragmentos de DNA de distintos tamaños, es posible conocer el peso molecular de cada uno (o su longitud medida en número de pares de bases), ya que la distancia recorrida por cada fragmento de DNA, con respecto a su punto de *siembra*, es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Para ello, es necesario realizar previamente el experimento con una mezcla de DNAs de pesos moleculares o longitud en pares de bases conocidos (patrones).

En esta Tesis se ha utilizado la electroforesis en gel de agarosa con dos objetivos:

- 1) determinación del tamaño promedio de los fragmentos de ct-DNA y del tamaño del pDNA utilizado.
- 2) determinación cualitativa de la composición del lipoplejo para la que se da la electroneutralidad (carga neta nula). Cuando se desplaza el DNA a través del gel de agarosa tras aplicar el campo eléctrico, significa que no ha interactuado con el liposoma mixto pero sí con el bromuro de etidio, que se encuentra intercalado entre las hélices del DNA. Cuando no hay desplazamiento a través del gel agarosa significa que ha interactuado el liposoma mixto con el plásmido, lo que conlleva a la expulsión del EtBr de entre las hélices del DNA hacia el medio. Con esta técnica podemos determinar, de una forma cualitativa, la composición del lipoplejo para la que se da la electroneutralidad y compararla con la obtenida a partir del potencial zeta y de espectroscopía de fluorescencia.

La figura 2.6 muestra un esquema de una célula electrolítica. Está constituida por una cubeta electrolítica y dos electrodos de signos opuestos entre los que se establece la diferencia de potencial responsable del campo eléctrico de 100 *mV*. El gel de agarosa junto con EtBr, en el seno de una disolución reguladora a *pH* = 8 (1x TAE (Tris-HCl, Acetato y EDTA)), se colocan en el soporte electroforético de la cubeta. Una vez finalizado el proceso, que dura unos 30 *min*, se hacen fotografías del gel de agarosa bajo una lámpara de luz Ultravioleta (transiluminador) a 365 *nm* durante 300 *ms*, para posteriormente ser analizadas con un equipo de tratamiento de imagen y fotografía térmica.<sup>29-31</sup>



**Figura 2.6** Esquema de una cubeta electrolítica para medir la electroforesis en gel.

### 2.3.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un caso particular de luminiscencia en el que la excitación óptica de un cromóforo y la emisión desde el mismo, tienen lugar a través de estados electrónicos singletes. Algunas sustancias naturales muestran fluorescencia intrínseca como resultado de la presencia de grupos aromáticos en su estructura. Sin embargo, en ocasiones es necesario introducir fluoróforos extrínsecos con el fin de adecuar las propiedades espectrales de las muestras a las necesidades de cada experimento. En particular, la emisión fluorescente de estos fluoróforos (o sondas fluorescentes) se puede utilizar para obtener información fisicoquímica acerca de cambios en las propiedades estructurales y dinámicas de los agregados coloidales, así como de las interacciones que tienen lugar entre ellos y moléculas biológicas, dado que el comportamiento fotofísico de estas sondas es extremadamente sensible al entorno que les rodea.<sup>32</sup> De hecho, el éxito de la espectroscopía de fluorescencia para los estudios dinámicos y estructurales de sistemas biológicos se debe a su gran sensibilidad, a su capacidad de respuesta a cambios en el microentorno de la molécula emisora, debido a la especificidad de las características de la fluorescencia (espectros, rendimiento cuántico, tiempos de vida media) y a la posibilidad de proporcionar información espacial y temporal. La mayoría de los fluoróforos empleados a este respecto, poseen un anillo aromático unido a un sustituyente electrodonador y a otro electroaceptor situados generalmente en posición *para*. Existen muchas sondas fluorescentes de múltiples características capaces de dar información muy variada y específica.

En esta Tesis se han llevado a cabo dos tipos de experimentos en los que se han utilizado tres sondas fluorescentes diferentes:

- i. *Intercalación de sondas fluorescentes en la hélice de DNA*: permite conocer la tipología de la interacción liposoma-DNA, así como la micropolaridad de los

entornos en los que se halla la sonda, y determinar la composición del lipoplejo para la que se da la electroneutralidad del sistema. Sondas utilizadas: EtBr y GelRed<sup>TM</sup>.

- ii. *Anisotropía de fluorescencia*: se obtiene la temperatura de transición gel-fluido del liposoma mixto, en ausencia y presencia de DNA, e información relativa a la fluidez de la membrana lipídica y cómo esta propiedad se ve modificada por la interacción con DNA. Sonda utilizada: DPH.

*i. Intercalación de sondas fluorescentes en la hélice de DNA*

Se trata de un método indirecto de medida, mediante el cuál se obtiene información de la interacción liposoma-DNA a través del seguimiento de la variación de la emisión fluorescente de una sonda que se encuentra intercalada en la doble hélice del DNA cuando éste no interacciona con el liposoma, pero que es desplazada al medio cuando se forma el lipoplejo. Puesto que los lípidos y el DNA están desprovistos de grupos fluoróforos, en esta Tesis se ha utilizado una de las sondas fluorescentes extrínsecas más conocidas en bioquímica: el *bromuro de etidio* (EtBr), cuya estructura y características espectroscópicas se mostraron en el apartado 2.1.4. Esta sonda fluoresce débilmente en medios acuosos y su intensidad llega a incrementarse entre 10 y 30 veces cuando se intercala entre los pares de bases del DNA.<sup>3</sup> El aumento de intensidad de fluorescencia en este tipo de sondas ocurre frecuentemente por la estabilización del grupo fenilo, si bien este no es el caso del bromuro de etidio, dado que, al intercalarse entre las bases del DNA, esta sonda coloca el fenilo fuera de las mismas, de manera que puede rotar libremente hasta adquirir su configuración de mínima energía, perpendicularmente al resto de la molécula. Sin embargo, es el entorno hidrofóbico situado entre las bases del DNA el que se cree responsable del aumento de la intensidad. Al intercalarse en dicho entorno hidrofóbico, el catión etidio expulsa las moléculas de agua que tiene asociadas, y que son responsables de la desactivación de la fluorescencia, permitiendo, de este modo, un aumento en la emisión de fluorescencia. Además, gracias a esta intercalación, el EtBr se protege de otros procesos de desactivación provocados por el oxígeno molecular. Cuando el DNA forma parte del lipoplejo, el EtBr es incapaz de intercalarse entre las bases del DNA, siendo desplazado del interior de la hélice al medio acuoso, de manera que se produce la desactivación de la fluorescencia al quedar totalmente accesible al agua y al oxígeno molecular.<sup>3</sup> Es por ello que se pueden estudiar las interacciones del DNA con los liposomas, midiendo la variación de la intensidad de fluorescencia de la sonda en función de las concentraciones de lípido y DNA presentes en

el medio.<sup>4-7,33</sup> Sin embargo, precisamente por su capacidad para intercalarse entre los pares de bases del DNA, el EtBr está considerado en la actualidad como un agente altamente mutagénico cuyo uso en laboratorio debe evitarse a toda costa. Por esta razón, en el transcurso de esta Tesis, hemos sustituido el EtBr por otra sonda fluorescente, el GelRed<sup>TM</sup>, cuya estructura es una patente registrada que presenta un comportamiento fotofísico muy similar al del EtBr. Es extremadamente estable en el tiempo, no mutagénico (no puede atravesar la membrana plasmática celular), ni citotóxico, seguro para el medio ambiente (se puede eliminar por el desagüe) y más sensible que el EtBr.

La excitación de este tipo de sondas fluorescentes conduce a la formación de un estado excitado local, mediante una transición electrónica del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ .<sup>3</sup> Han surgido discrepancias con respecto a la existencia de otros estados excitados así como de los mecanismos mediante los cuales estos estados excitados se forman y se desactivan. En los últimos años una nueva aproximación ha surgido desde diversos grupos de investigación, que intenta explicar el proceso de fluorescencia de estas sondas en su aplicación a agregados supramoleculares.<sup>9,34-37</sup> Esta aproximación se basa en que la banda de emisión  $\pi \rightarrow \pi^*$  obtenida experimentalmente es la envolvente de un número determinado de componentes de emisión (bandas gaussianas) a diferentes longitudes de onda solapadas. Cada banda gaussiana puede ser asignada, a su vez, a transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  correspondientes a la emisión de la sonda fluorescente alojada en los distintos posibles microentornos del medio, caracterizados por diferentes propiedades tales como la micropolaridad, la rigidez, la microviscosidad y/o las características de solvatación. De este modo, se puede llevar a cabo una deconvolución de la banda de emisión de fluorescencia en un número óptimo de bandas reproducibles, y basándose en las propiedades esperadas o conocidas, asignar cada banda a cada uno de los microentornos de diferente polaridad en los que se encuentra distribuida la sonda. Se puede, por tanto, caracterizar los distintos microentornos del sistema coloidal en ausencia y presencia de DNA.

## *ii. Anisotropía de fluorescencia*

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se basan en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Cuando una población de fluoróforos se excita con luz linealmente polarizada, la probabilidad de excitación de una molécula de fluoróforo depende de la orientación de su momento dipolar de absorción con respecto a la dirección del vector campo eléctrico de la luz de excitación. De este modo, se excitan

preferentemente las moléculas de fluoróforo cuyo momento de transición está orientado en una dirección próxima a la del vector campo eléctrico de la luz de excitación, lo que se conoce como fotoselección.<sup>3</sup> La excitación selectiva da lugar a una población de fluoróforos parcialmente orientada y por tanto a una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada.

Cualquier cambio en la orientación del momento dipolar de absorción del fluoróforo durante el tiempo de vida media del estado excitado, provoca una disminución de la anisotropía de la fluorescencia emitida. Existen numerosos factores que producen una despolarización de la fluorescencia emitida, entre los que se pueden mencionar las vibraciones torsionales, la transferencia de energía de excitación a otra molécula con diferente orientación, la difusión rotacional de la molécula excitada y los cambios en la viscosidad del disolvente.<sup>3</sup>

En disoluciones fluidas, las moléculas se desplazan angularmente al azar debido al movimiento browniano inducido térmicamente, de modo que la distribución angular inicial de moléculas creada tras la excitación se va destruyendo progresivamente con el tiempo. A partir de la extensión con que se produce la despolarización de la fluorescencia, se puede obtener información sobre los movimientos moleculares, que dependen de la forma y tamaño de las moléculas, y sobre la fluidez del microentorno.

La anisotropía de emisión de fluorescencia en estado estacionario de una solución excitada con luz polarizada linealmente se puede calcular mediante la siguiente expresión:

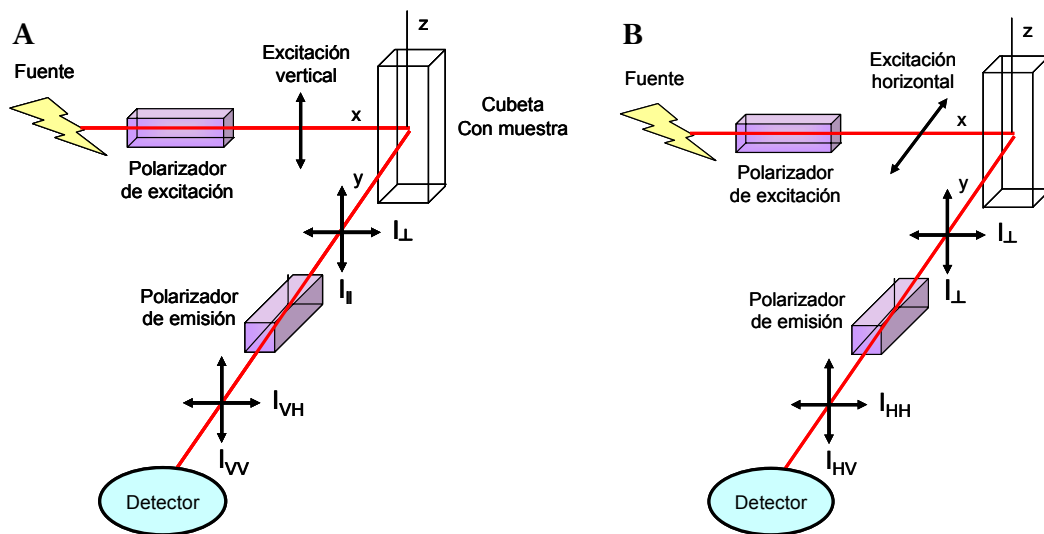
$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{total}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.5)$$

donde  $I_{\parallel}$  y  $I_{\perp}$  son las componentes de la emisión de fluorescencia en la direcciones paralela y perpendicular respectivamente a la dirección del plano de polarización de la luz de excitación.

Generalmente, los monocromadores tienen diferentes eficiencias de transmisión para la luz polarizada vertical y horizontalmente, de tal manera que las intensidades medidas por el instrumento no son la paralela y perpendicular,  $I_{\parallel}$  y  $I_{\perp}$ , sino intensidades proporcionales a la eficiencia de la transmisión del monocromador para cada componente polarizada. Si la muestra es excitada con luz polarizada verticalmente se pueden observar dos intensidades diferentes,  $I_{VV}$  y  $I_{VH}$ , en función de la posición del polarizador de emisión, vertical u horizontal respectivamente (figura 2.7). Es necesario, por tanto, conocer para cada equipo las sensibilidades de los canales de emisión para las componentes



polarizadas vertical y horizontalmente. Para ello, se define un factor  $G$  que tiene en cuenta estas sensibilidades y otros factores instrumentales. Este factor depende de la longitud de onda de emisión y se puede determinar experimentalmente.



**Figura 2.7.** Diagrama esquemático de la medida de anisotropía de fluorescencia. A) Cuando la luz se polariza verticalmente la emisión de luz polarizada puede orientarse paralela o verticalmente ( $I_{\parallel}$  o  $I_{\perp}$ ) de manera que se observa la intensidad polarizada verticalmente en la excitación y en la emisión,  $I_{VV}$ , y la intensidad polarizada verticalmente en la excitación y horizontalmente en la emisión,  $I_{VH}$ . B) Si la luz se polariza horizontalmente entonces la muestra emite luz polarizada verticalmente ( $I_{\perp}$ ), pudiendo distinguir entre la intensidad polarizada horizontalmente en la excitación y en la emisión,  $I_{HH}$ , y la intensidad polarizada verticalmente en la excitación y en la emisión,  $I_{HV}$ .

Finalmente, la anisotropía puede determinarse introduciendo el factor  $G$  en la ecuación 2.5, lo que conduce a:<sup>3</sup>

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2.6)$$

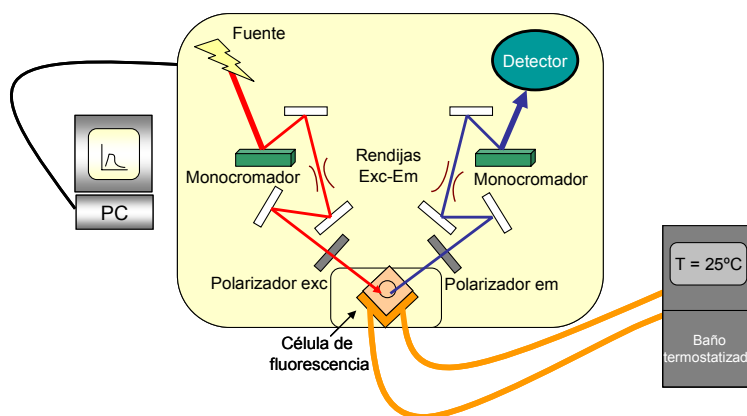
Las medidas de anisotropía de fluorescencia se han utilizado ampliamente en la bibliografía para la obtención de información sobre la forma, el tamaño, la rigidez o la flexibilidad de moléculas biológicas, así como para el estudio de interacciones moleculares proteína - proteína, proteína - ligando o proteína - ácidos nucleicos. También resulta una herramienta muy útil para valorar la rigidez de las membranas lipídicas, dado que una sonda fluorescente puede reflejar distintos modos rotacionales en función de la fluidez de la membrana. Una disminución en la rigidez de la membrana genera una mayor capacidad de rotación de la sonda, y por tanto una disminución de la anisotropía.<sup>3,12</sup> Por ello, a partir de medidas de variación de anisotropía de fluorescencia con la temperatura se puede

determinar la temperatura de transición gel-fluido, característica de cada lípido. Asimismo, puesto que la membrana ve alterada sus propiedades al interactuar con el DNA para formar el lipoplejo, la medida de la anisotropía en estos sistemas también aporta interesante información sobre esta interacción.

La sonda DPH utilizada en anisotropía se intercala entre el entorno lipídico donde se solubiliza. Se utiliza para marcar membranas y bicapas lipídicas debido a su baja solubilidad y su desactivación de emisión cuando se encuentra libre en disolución acuosa. Solo se observa intensidad de emisión cuando se encuentra inmersa en la membrana.

Todas las medidas de espectroscopia de fluorescencia descritas en este apartado se han llevado a cabo con un espectrofluorímetro *Perkin-Elmer LS-50B* (Perkin-Elmer Ltd., Reino Unido), cuyo esquema se muestra en la figura 2.8. Posee las siguientes características:

- Lámpara de xenón* pulsada (frecuencia de pulso de 50 *Hz* y una potencia equivalente de 20 *kW* durante 8  $\mu s$ ).
- Monocromadores Monk-Gillieson*:  $200 < \lambda_{ex} < 800 \text{ nm}$  y  $200 < \lambda_{em} < 900 \text{ nm}$ .
- Rendijas* de excitación (entre 2,5 y 15,0 *nm*) y de emisión (entre 2,5 y 20,0 *nm*).
- Polarizadores* de excitación y emisión *Perkin-Elmer L225 0100*.
- La velocidad de barrido, a escoger dentro del intervalo 10 - 1500 *nm/min*.
- Cubeta de cuarzo* termostatzada (10 *mm* de paso óptico y capacidad máxima de 3 *mL*). La temperatura de la muestra se controla con una precisión de  $\pm 0,01 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 2.8.** Esquema del espectrofluorímetro *Perkin-Elmer LS-50B*.

El espectrofluorímetro está conectado a un ordenador mediante un puerto de serie *RS-232C*. Tanto el control del espectrofluorímetro y de sus parámetros como el almacenamiento de los datos y espectros en el ordenador se llevan a cabo haciendo uso del programa informático *FL Winlab v4.00.02* (Perkin-Elmer Ltd., Reino Unido).

Todas las características descritas permiten obtener los espectros con una sensibilidad de  $\pm 1 \text{ nm}$  y una reproducibilidad de  $\pm 0,5 \text{ nm}$ .

### 2.3.4. CRIO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La microscopía electrónica ha revolucionado el conocimiento de ciencias como la biología o la medicina, extendiéndose también a la gran mayoría de disciplinas científicas, incluidas las de materiales. La principal ventaja que presenta este tipo de microscopía es que alcanza una gran amplificación de la imagen de la muestra con una resolución casi mil veces mayor que con el microscopio óptico, gracias a que la fuente de iluminación utilizada es un haz de electrones. De hecho, la microscopía electrónica se desarrolló a principios del siglo pasado debido a las limitaciones de resolución de imagen de la microscopía óptica, impuesta por la longitud de onda de la luz visible. Este hecho es fácil de entender si se tiene en cuenta que, en términos clásicos, la mínima distancia de resolución  $\delta$  de un microscopio, viene dada por:<sup>38</sup>

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{n_r \sin \gamma} \quad (2.7)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación,  $n_r$  es el índice de refracción del medio y  $\gamma$  es el semiángulo de recopilación de la lente magnificadora ( $n_r \sin \gamma \approx 1$ ). De esta ecuación se deduce que, cuanto menor sea la longitud de onda de la radiación, mayor es la resolución del microscopio, de modo que se podrán resolver u observar distancias más pequeñas. Por tanto, si la radiación incidente es un haz de electrones, la resolución puede llegar a la escala atómica.

La microscopía electrónica ha derivado en muchas técnicas, entre las que destacan: microscopía electrónica de barrido (*SEM*), microscopía electrónica de efecto túnel (*STM*), microscopía electrónica de fuerza atómica (*AFM*) o microscopía electrónica de transmisión (*TEM*). En esta Tesis se ha utilizado *TEM*, que, a diferencia de las otras microscopías, no explora superficies, sino que el haz de electrones incidente atraviesa la muestra. El microscopio electrónico de transmisión (*TEM*) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado, mediante una diferencia de potencial de  $100 \text{ keV}$  en condiciones de alto vacío, colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos

son conducidos y modulados por unas lentes electromagnéticas para formar una imagen final sobre una *CCD* que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes. La imagen obtenida ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si ésta es amorfa o cristalina. Para reducir el daño causado por la irradiación y por el vacío, y para aumentar el contraste de la imagen, que suele ser pobre, resulta esencial preparar adecuadamente las muestras que se van a observar.<sup>39</sup>

- i. La técnica de *tinción negativa* consiste en sumergir la muestra en una disolución salina de un metal pesado (U, Mo o W) que desplaza al agua. El contraste se produce entre la disolución metálica, que dispersa fuertemente el haz de electrones, y la muestra que los dispersa poco. Tiene el inconveniente que la resolución está limitada por el tamaño de los granos de sal pesada, a unos 1,5-2 *nm*.
- ii. La *crio-microscopía electrónica de transmisión* se basa en vitrificar la muestra para protegerla del vacío y disminuir el daño por radiación. Provocando congelaciones ultrarrápidas se consigue que el agua permanezca en forma vítrea, con lo que no aparecen cristales de hielo que dañen la muestra. El contraste es menor, pero más fidedigno. Además no impone ninguna limitación a la resolución y la muestra se mantiene en la disolución fisiológica inicial.

Los espectaculares avances realizados en tecnología informática han permitido el desarrollo de programas capaces de mejorar el tratamiento y análisis de las imágenes extraídas en microscopía electrónica, entre los que destaca el programa *EMAN*. Este programa genera una imagen tridimensional preliminar a partir de las imágenes previamente localizadas y seleccionadas en la micrografía. A continuación, el modelo inicial es refinado mediante un proceso iterativo en el que se utiliza la clasificación de las múltiples proyecciones de las imágenes micrografiadas. *EMAN* proporciona reconstrucciones de imágenes con resoluciones por debajo de 1 *nm*, consideradas, por tanto, de alta resolución, a partir de los datos disponibles.<sup>40</sup>

Nuestro interés por la microscopía electrónica de transmisión como técnica de caracterización radica en que permite visualizar y obtener información acerca de la estructura, morfología y tamaño de los liposomas y lipoplejos estudiados en la Tesis. Para ello, se han utilizado los microscopios *JEOL JEM-1230* (JEOL, Ltd., Japón) del Centro de

Investigaciones Biológicas ((CIB-CSIC) de Madrid), y JEOL JEM-2011 del Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona (ver figura 2.9).



**Figura 2.9.** Fotografía del microscopio electrónico JEOL JEM-1230 y JEOL JEM-2011

Estos equipos están constituidos por los siguientes componentes:

- a) *Fuente.* Constituida por un filamento de  $\text{LaB}_6$ , emite un haz de electrones acelerados mediante una diferencia de potencial de entre 40 y 120  $kV$ .
- b) *Lentes condensadoras.* Son lentes electromagnéticas con las que se enfoca y se modifica la intensidad del haz de electrones.
- c) *Solenoides de deflexión (potenciómetros).* Aplicando un campo magnético local, modifican el ángulo de inclinación (puede variar entre  $-60^\circ$  y  $60^\circ$ ) con respecto a la vertical (eje óptico) del haz incidente, o lo redirigen a algún lugar de la muestra de cierto interés. Se sitúan entre la segunda y la tercera lentes condensadoras.
- d) *Lentes objetivo.* Dispersan los electrones que atraviesan la muestra, creando un comportamiento de difracción en el plano focal inverso. Mediante la apertura de objetivo y lentes intermedias de difracción se recombinan los electrones formando la imagen.
- e) *Lentes proyectoras.* Tienen como función aumentar la imagen procedente de la lente objetivo. El aumento que se puede obtener oscila entre  $50\times$  y  $600000\times$ .
- f) Cámara de proyección *TemCam-F416 (TVIPS) 4k x 4k*. La imagen se graba en películas *Kodak 4489* y *Kodak SO-163*.
- g) *Bomba de alto vacío.* Aplicado a toda la columna del microscopio electrónico, permite que los electrones la atraviesen, interaccionen con la muestra y puedan llegar a la cámara de proyección.<sup>41</sup>

- h) Escáner *Dimage Scan Multi Pro* (Konica Minolta Europe GmbH, Alemania). Se utiliza para digitalizar las películas microfotográficas.

El equipo permite corregir la aberración esférica (la distancia focal es distinta en el centro que en los bordes de la lente) y la aberración cromática (electrones con distintas energías no son enfocados del mismo modo), así como el astigmatismo (el campo eléctrico creado por la lente objetivo no es perfectamente simétrico provocando una disminución de la resolución en una dirección). Aplicadas todas las correcciones, el equipo puede medir con una resolución de hasta 0,4 nm.

### 2.3.5. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

La Microscopía Confocal es una técnica que se engloba dentro de la microscopía de fluorescencia, la cuál permite el estudio de muestras con marcaje fluorescente, haciendo secciones ópticas de las mismas mediante la excitación de la muestra punto a punto por medio de un barrido láser. La microscopía confocal es una de las técnicas más utilizadas actualmente gracias al desarrollo de nuevas sondas fluorescentes y por el aumento de resolución que proporciona. La técnica fue patentada por Minsk en 1957,<sup>42</sup> y los primeros microscopios con validez fueron descritos por Petran en 1968,<sup>43</sup> aceptándose y utilizándose al desarrollarse el láser y el ordenador personal durante los años 80.<sup>44,45</sup>

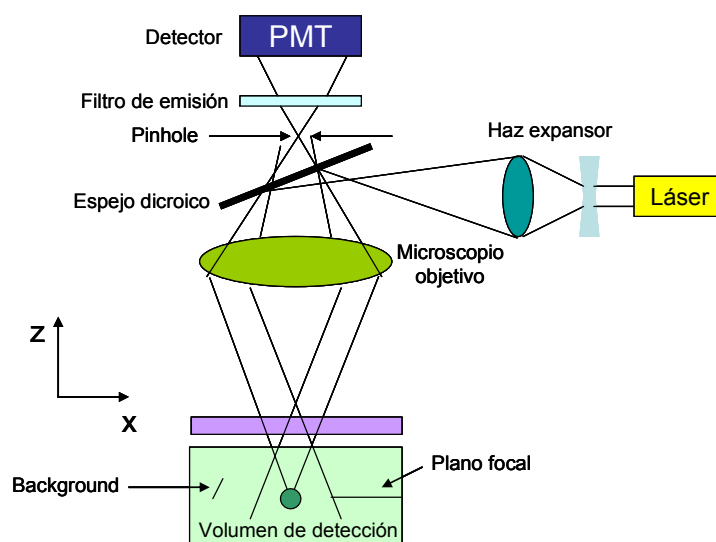
En un barrido puntual confocal<sup>46</sup> las lentes del microscopio (figura 2.10) enfocan la luz láser sobre un sólo punto de la muestra con gran intensidad (el punto focal). A continuación, el láser barre la muestra punto por punto generando la imagen tridimensional. El microscopio y el sistema óptico enfocan la luz emitida por el punto focal sobre un segundo plano, el punto confocal, y de éste llega al detector o fotomultiplicador a través del diafragma o *pinhole*, que es una pequeña abertura situada frente al detector que elimina de forma óptica toda la información que se encuentra fuera del plano focal (debido a que provoca una difuminación y pérdida de nitidez de la imagen),<sup>45</sup> por lo que sólo la información que se encuentre dentro de este plano será detectada con calidad.<sup>47-49</sup> En el detector, la luz reflejada es transformada en una señal eléctrica digitalizada, mediante un convertidor analógico digital que incrementa el contraste de las imágenes, y recogida en un ordenador como un píxel.<sup>50,51</sup>

Son numerosas las aplicaciones de la microscopía confocal dentro de las ciencias biológicas (biología celular y molecular, fisiología, microbiología, etc.) ya que permite identificar y localizar componentes moleculares específicos sin ser una técnica destructiva, permitiendo observaciones *in vivo*. Se pueden hacer estudios 3D por secciones, co-

localización de sondas fluorescentes, rastreo de moléculas o iones dentro de las células vivas, medidas de células, orgánulos y determinación de volúmenes. También encuentra aplicación en la ciencia de materiales, puesto que permite realizar un estudio morfológico de polímeros, resinas, minerales, cerámicas, metales, etc.<sup>52</sup>

Con la microscopía confocal se observan imágenes definidas al realizar cortes muy finos de la muestra, observando un plano concreto (confocal) de la muestra con nitidez, pudiéndose ver las estructuras de las células, e imágenes tridimensionales de las diferentes estructuras que no se pueden observar con el microscopio óptico convencional. Pero al igual que muchas otras técnicas, la microscopía confocal presenta ciertos requisitos y limitaciones como son: a) las muestras a observar deben ser planas; b) el microscopio es invertido por lo tanto las muestras deben ir provistas de un cubreobjetos de 0,17 mm, optimizándose el funcionamiento de los objetivos al mismo tiempo que se protegen.

Esta técnica es ampliamente utilizada en terapia génica con el fin de discernir si las células transfectadas, previamente teñidas con una disolución de la sonda fluorescente Propidium Iodide (PI), han liberado el plásmido de DNA y han expresado la proteína en concreto (que en nuestro caso es la proteína *GFP*) en el núcleo celular con efectividad. En este trabajo se han utilizado las células *HEK293T*, cuyos resultados fueron contrastados con las células *COS7*, *HeLa*, *CHO*, *U343* y *H460*. Cuando la célula presenta coloración roja, significa que no se ha liberado ni expresado el plásmido, es decir, la célula se encuentra teñida con *PI*. Sin embargo, si la célula posee una coloración verde implica que la mayor parte del plásmido ha sido liberado y expresado produciendo la proteína *GFP*. Cuando presentan una coloración amarillenta o anaranjada significa que no todo el plásmido ha sido liberado y expresado debido a que parte ha sido destruido por las DNAsas que se encuentran en el medio celular. Gracias a este estudio colorimétrico podemos dilucidar si un liposoma mixto es o no eficiente como vector coloidal y como transportador y liberador del plásmido de DNA en el citoplasma celular.



**Figura 2.10.** El haz del láser es dirigido sobre un punto concreto del plano focal. La fluorescencia emitida por la muestra es dirigida y captada por un fotodetector atravesando el diafragma o pinhole. La imagen focal se obtiene tras hacer un barrido de la muestra con el láser. Los fotodetectores (PMTs) transforman la señal lumínica en una señal eléctrica que mediante el sistema informático acoplado, se traduce en un píxel. Cada píxel/voxel informa acerca de la localización tridimensional del punto excitado y de la intensidad lumínica de dicho punto.

En esta Tesis, se ha utilizado el microscopio Zeiss LSM 510-META (figura 2.11), ubicado en Indian Institute of Science, IISc, Bangalore<sup>53</sup> que es un microscopio confocal espectral. También cuenta con un *microscopio invertido DM IRBE2* para campo claro en luz transmitida y fluorescencia en luz incidente con una dotación óptica para contraste interferencial. El equipo (figura 2.11)<sup>47,52,54</sup> consta de:

- Fuente.** Posibilidad de seleccionar siete líneas láser dependiendo de las sondas fluorescentes utilizadas y de las longitudes de onda,  $\lambda$ . Presentan una potencia máxima de 25 mW (a 405 nm), 30 mW (a 458, 477, 488 y 514 nm) y 1 mW (para 543 y 546 nm).
- Filtros de fluorescencia y diafragma de iluminación (abertura de excitación).** Seleccionan los intervalos de longitud de onda que pueden atravesar la lente objetivo e incidir en la muestra.
- Espejo dicroico o separador de haz.** Es una combinación de espejos dicroicos que enfocan la luz emitida.
- Lentes objetivos del microscopio invertido Axiovert 200 de campo ancho.** Forman las imágenes ópticas con gran calidad y resolución, siendo importante: la apertura numérica ( $N.A.$ ), que determina el tamaño del punto de medida que influye en la anchura de la rendija óptica accesible; y el índice de refracción,  $n_r$ , que mejora la calidad de la imagen.



- e) *Diafragma de detección (abertura de emisión)*. Discriminador de anchura, profundidad e intensidad, que elimina todas las longitudes de onda de emisión que no pertenecen al intervalo seleccionado.
- f) *Detector*. Dos fotomultiplicadores (*PMT*) y un detector policromático *META*, que actúa como un tercer *PMT*. Detectan los fotones emitidos o reflejados por cada punto de la muestra con gran velocidad y sensibilidad, los amplifican y los convierten en píxeles que formarán una imagen bidimensional o tridimensional con un elevado contraste, calidad y resolución una vez realizado el barrido completo, punto a punto, de la muestra.

Es importante tener en cuenta que: a) la profundidad de la sección óptica depende del diámetro de la abertura, de la longitud de onda y de la apertura numérica del objetivo; b) El espesor óptico,  $eo$ , depende de la longitud de onda, de la apertura numérica de las lentes objetivo, del índice de refracción,  $n_r$ , y del diámetro de la abertura,  $DA$ .

$$eo \sim \frac{(DA)n_r\lambda}{(N.A.)^2} \quad (2.8)$$

La calidad del espectro depende del número de imágenes recogidas a diferentes longitudes de onda, del tamaño de las bandas, de la sensibilidad y de la reproducibilidad del dispositivo que recoge los datos.



**Figura 2.11.** Fotografía del equipo Zeiss LSM-510 META con microscopio invertido Axiovert 200.

### 2.3.6. DISPERSIÓN DE RAYOS X A BAJO ÁNGULO (SAXS)

La dispersión de Rayos-X a bajo ángulo, junto con su distribución de intensidades, se utiliza para obtener información acerca del tamaño, forma y diversos parámetros estructurales de las bicapas lipídicas que se encuentran interaccionando con el DNA, cuyas propiedades influyen en la eficiencia de transfección. Este estudio se ha realizado a diferentes composiciones de liposoma mixto y a diferentes relaciones de carga liposoma catiónico/DNA.

Con esta técnica se obtiene la intensidad y el vector de ondas,  $q$  ( $\text{nm}^{-1}$ ), los cuáles se representan formando difractogramas. Estos difractogramas contienen los denominados picos *Bragg*, que corresponden a diferentes valores de  $q$  ( $\text{nm}^{-1}$ ) con los que por medio de la *ley de Bragg* (ecuación 2.9), y para una reflexión dada ( $hkl$ ), se obtienen los valores del espaciado,  $d$  ( $\text{nm}$ ), que caracterizan a cada tipo de estructura.

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} \quad (2.9)$$

sabiendo que  $d = 2\pi/q$ . El vector de ondas,  $q$ , refleja el proceso en el cual los fotones de los rayos X transfieren energía a los electrones con los que interaccionan. La siguiente ecuación describe la relación de la longitud del vector de ondas,  $q$ , y el ángulo de dispersión,  $2\theta$ , ampliamente utilizado en los métodos de dispersión de rayos X:<sup>55</sup>

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (2.10)$$

La intensidad medida,  $I$ , como una función del vector de ondas,  $q$ , se presenta en la siguiente ecuación:

$$I(q) = 4\pi \int_0^\infty P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (2.11)$$

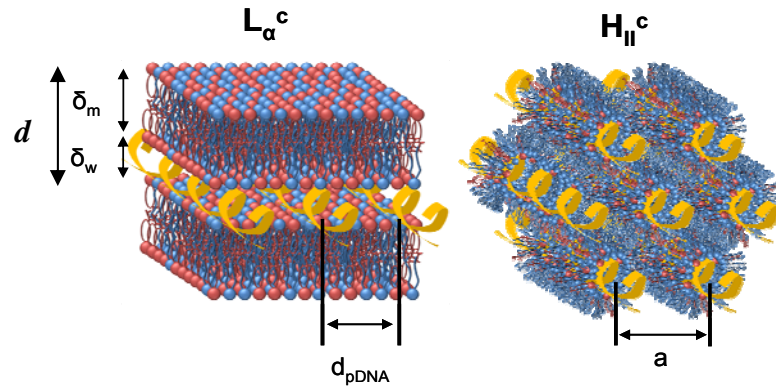
La distribución de la distancia par,  $p(r)$ , es la representación geométrica del objeto en el haz que determina las distancias de todos los pares de electrones dentro de la partícula, la cuál se encuentra relacionada con la intensidad de dispersión,  $I$ , a través de la *transformada de Fourier*.

Conociendo el valor de la distancia de espaciado,  $d$ , de cada pico *Bragg*, que se corresponde con una determinada reflexión (tabla 2.2), se asignará a cada lipoplejo un tipo de estructura. Estas estructuras pueden ser lamelar, cúbica o hexagonal.<sup>56,57</sup>

|   | lamelar | scc             | bcc             | fcc                | hexagonal       |
|---|---------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| 1 | 1 (100) | 1 (100)         | 1 (110)         | 1 (111)            | 1 (10)          |
| 2 | 2 (200) | $2^{1/2}$ (110) | $2^{1/2}$ (200) | $4/3^{1/2}$ (200)  | $3^{1/2}$ (11)  |
| 3 | 3 (300) | $3^{1/2}$ (111) | $3^{1/2}$ (211) | $8/3^{1/2}$ (220)  | $4^{1/2}$ (20)  |
| 4 | 4 (400) | $4^{1/2}$ (200) | $4^{1/2}$ (220) | $11/3^{1/2}$ (311) | $7^{1/2}$ (21)  |
| 5 | 5 (500) | $5^{1/2}$ (210) | $5^{1/2}$ (310) | $12/3^{1/2}$ (222) | $9^{1/2}$ (30)  |
| 6 | 6 (600) | $6^{1/2}$ (211) | $6^{1/2}$ (222) | $16/3^{1/2}$ (400) | $12^{1/2}$ (22) |
| 7 | 7 (700) | $8^{1/2}$ (220) | $7^{1/2}$ (321) | $20/3^{1/2}$ (331) | $13^{1/2}$ (31) |

**Tabla 2.2.** Tabla esquemática de los valores a los que deben aparecer los picos Bragg para saber si la estructura que poseen los lipoplejos es lamelar, cúbica o hexagonal. Los valores a la izquierda de cada columna son el valor de  $q$ , en  $\text{nm}^{-1}$ .

En la figura 2.12 se muestran los parámetros que se obtienen a partir de los difractogramas obtenidos y las estructuras lamelar y hexagonal.



**Figura 2.12** Parámetros y estructuras lamelar y hexagonal de los lipoplejos.

Cuando la estructura del lipoplejo es lamelar se caracteriza por poseer capas alternas de liposomas mixtos y hélices de DNA donde  $d$  es la suma del espesor de la bicapa lipídica,  $d_m$ , y de la capa acuosa de DNA,  $d_w$ . Esta capa acuosa de DNA es el espacio que ocupan las moléculas de agua que se encuentran formando una capa de hidratación alrededor de las hebras de DNA, el cuál debe ser de un espesor suficiente para alojar a la doble hélice de DNA. Este valor se obtiene a partir del espaciado,  $d$ , y del espesor de la bicapa,  $d_m$ , expresados ambos en  $\text{nm}$ :

$$d_w = d - d_m \quad (2.12)$$

El pico del difractograma que no es asignado a ninguna estructura corresponde a la correlación DNA-DNA, y su vector de ondas  $q_{DNA}$  permite obtener la separación entre las dobles hélices de DNA en la monocapa,  $d_{DNA}$ .

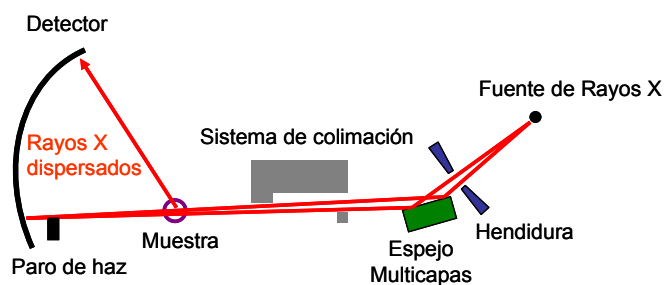
$$d_{DNA} = \frac{2\pi}{q_{DNA}} \quad (2.13)$$

La posición del pico de DNA varía en función de la composición lipídica de los lipoplejos y de las características de los lípidos que forman la bicapa.<sup>58</sup>

Los experimentos de SAXS se realizaron para obtener información estructural de los lipoplejos, utilizando un equipo *Bruker AXS Nanostar small-angle X-ray scattering* ubicado en el *Instituto Rocasolano del CSIC* de Madrid, que utiliza una radiación *Cu KR* a 1,54 Å de longitud de onda (figura 2.14), para los lipoplejos formados por liposomas catiónicos de una sola cabeza polar;<sup>59</sup> y el *European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)* Beamline16, ubicado en Grenoble (Francia), para los lipoplejos formados por lípidos catiónicos gemini.<sup>60</sup>

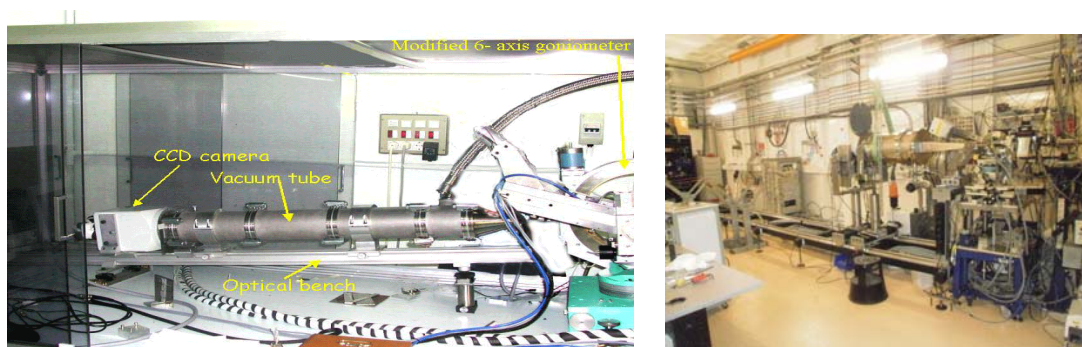
Con la técnica de SAXS se pretende separar el fuerte haz primario de rayos X de la débil información de dispersión cercana a este haz, e incrementar la intensidad de los rayos X dispersados. Los equipos constan de:

- a) *Fuente*. Producidos por un generador de ánodo rotatorio a longitudes de onda de 1,54 Å y 0,995 Å, respectivamente. Con una Energía de 12 keV.
- b) *Óptica concentradora con un sistema de colimación*. Incrementa el flujo de fotones a través de la muestra.<sup>55</sup>
- c) *Paro de haz o sistema de colimación*. Protege al detector de la exposición al haz de manera directa, es decir, discrimina toda la radiación que no esté en la longitud de onda seleccionada.
- d) *Detector*. Detectores *CCD* que capturan señales débiles de dispersión (figura 2.13).<sup>55,61-64</sup> Detecta los rayos X dispersados por medio de una cámara *CCD* de dos dimensiones, los cuáles se convierten a una dispersión unidimensional a través de un promedio radial.
- e) *Sistema electrónico*. Las imágenes obtenidas son sometidas a un proceso de corrección, y para ello se resta de la imagen la señal producida espontáneamente por excitación térmica (campo oscuro) y se divide por una imagen de un campo homogéneo (campo plano) que permite corregir las diferencias de sensibilidad en diferentes regiones del detector y corregir parcialmente defectos ópticos en la cámara o las lentes del instrumento utilizado. Posee una elevada resolución de recogida de datos.



**Figura 2.13.** Instrumento de dispersión de rayos X en ángulo pequeño que incluye una fuente, sistema de colimación con óptica (espejo), soporte de muestra y detector. El área a la que entra el haz después de pasar el espejo es eliminada para reducir la dispersión no deseada de las moléculas de gas.

Los pixeles de resolución determinan la distancia requerida entre el detector y la muestra. En los equipos de SAXS utilizados en esta Tesis, la distancia de la muestra al detector es de 0,63 m para el equipo del CSIC y de 1,40 m para el equipo del ESRF.



**Figura 2.14.** Bruker AXS Nanostar small-angle X-ray scattering instrument (CSIC) y beamline 16 (Sincrotrón de Grenoble, Francia).

### 2.3.7. FLOW ASSISTED CELL SORTING O CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS)

La citometría de flujo evalúa características físicas y químicas de numerosas células o partículas en suspensión que atraviesan una fuente de luz (láser), emitiendo señales luminosas que permiten diferenciar las diferentes subpoblaciones celulares que existen dentro de una misma muestra, obteniendo, por tanto, información acerca del tamaño celular, granularidad y complejidad interna, intensidad de fluorescencia, potencial de membrana, viabilidad celular y su interacción con los anticuerpos monoclonales y con sus fluorocromos.<sup>65</sup>

Durante los años cincuenta se desarrolló una tecnología que permitió realizar estudios de las bacterias, pero no fue hasta los años 60 cuando comenzaron las primeras aplicaciones gracias al perfeccionamiento de la cámara de flujo, y hasta los años 70 cuando se empezaron a producir las primeras unidades. Además, paralelamente se desarrolló la

separación celular por deflexión electrostática, que es un híbrido entre un citómetro de flujo y una impresora, por lo que se denominó *FACS* (*Fluorescence Activated Cell Sorting* o *Flow Assisted Cell Sorting*).

Las células que viajan en el torrente líquido o sistema de flujo son impactadas por un rayo láser cuando atraviesan un determinado punto, emitiendo fluorescencia a una longitud de onda que depende de la fuente de luz láser, y desviando la luz a otra longitud de onda diferente que dependerá de las características de cada célula. Esta longitud de onda emitida pasa a través de un sistema de lentes y espejos que concentran esta luz y la transforman en pulsos de voltaje, los cuales son codificados, registrados e interpretados, es decir, amplificados y convertidos en señales eléctricas que son interpretadas gráficamente. Este voltaje se asocia con una amplitud proporcional al número total de fotones de luz recibidos por el detector.<sup>66</sup>

Si a la suspensión celular se le adiciona un fluorocromo que posee una determinada afinidad por algún componente celular y es excitable por la radiación láser, se observará y detectará una variación en la longitud de onda de emisión de éste, dando lugar a la formación de rangos o canales de fluorescencia, lo que facilitará la identificación de numerosos subgrupos de manera específica dentro de las poblaciones celulares.<sup>66,67</sup> El *FACS* es el primer sistema que proporcionó un análisis estándar multicolor gracias a la utilización de un doble láser con compensación interhaz, con un diseño óptico libre de alineación, con elevada sensibilidad, mínima compensación y máxima flexibilidad en la elección de sondas fluorescentes. Al poseer un elevado rendimiento es utilizado para análisis rutinarios de células, para desarrollar ensayos de verificación e identificación de una cierta población celular, presentando, por tanto, una amplia variedad de aplicaciones clínicas y de investigación. Al ser una técnica modular, de fácil manejo, rápida, precisa y compacta, se simplifica el análisis, permitiendo identificar numerosos subgrupos de linfocitos, células madre, leucocitos y reticulocitos. Además, también se pueden realizar análisis de DNA, estudios de la función inmunológica,<sup>66</sup> inmunoensayos con el cordón umbilical, análisis multiplex de transducción de señales, fosforilación, diagnóstico de patologías hematológicas, apoptosis, viabilidad celular, ensayos funcionales (metabolismo oxidativo, proliferación, calcio intracelular, pH...) y separar las células de acuerdo a un subtipo en estudios bioquímicos (*cell sorting*), entre otras.

Las características del citómetro de flujo más importantes son, su elevada sensibilidad para detectar las sondas fluorescentes a diferentes longitudes de onda; su especificidad, ya que ofrece información relativa que se cuantifica correlacionando los

canales de fluorescencia con resultados de muestras conocidas; su elevada resolución que se mide como un coeficiente de variación; la desviación estándar relativa de la señal promedio producida por las células o partículas analizadas, lo que significa que la resolución dependerá de la estabilidad de la fuente de luz, del flujo de la muestra, de su anchura, de la intensidad de la señal y de la luminiscencia del fondo o ruido; su elevada velocidad de análisis (5000 células/s); y del número de parámetros medibles por cada muestra, ya que se utilizan uno o dos láseres y cuatro lentes, con lo que se pueden analizar hasta seis parámetros a la vez.<sup>68</sup>

El equipo que se ha utilizado para determinar la morfología, granularidad y complejidad interna de las células incubadas con los lipoplejos estudiados en esta Tesis, fue el *BD FACSCalibur* (figura 2.15) junto con el Software *WinMDI2.8* ubicado en el IISc, Bangalore (India). Las medidas de los lipoplejos gemini/DOPE con cabezas polares amonio se realizaron por medio del proceso cell sorting o *FACS<sup>TM</sup>*.



**Figura 2.15.** Equipo BD FACSCalibur

Este equipo está constituido por:

- a) *Sistema de inyección.* La muestra es introducida a diferentes velocidades (60, 35 y 12  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) y atraviesa el haz del rayo láser<sup>65</sup> estableciendo un flujo laminar, lo que permite que la suspensión celular atraviese la cámara de flujo de manera estable e individual. Este flujo se determina a partir del número de Reynolds.

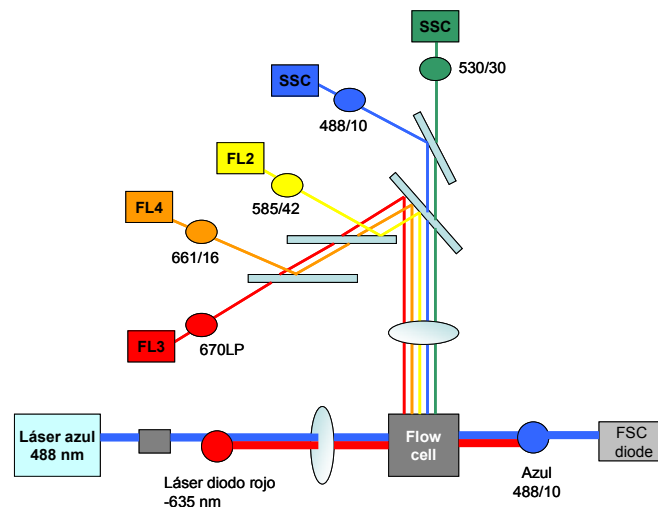
$$\text{Re} = \frac{\partial V(DT)}{\mu} \quad (2.14)$$

siendo  $DT$  el diámetro del tubo,  $V$  la velocidad del fluido,  $\partial$  la densidad del fluido y  $\mu$  la viscosidad. Cuando  $Re$  es menor de 2300 presenta un flujo laminar, pero cuando es mayor tiene un flujo turbulento con difusión acelerada.

- b) *Fuente.* Contiene 2 láseres, un láser de Argón refrigerado con aire a 488 nm y 15 mW de potencia y un láser diodo rojo opcional que emite a 635 nm. La luz emitida se utiliza

para excitar fluorocromos y provocar la dispersión de luz que nos informa de las características celulares.

- c) *Lentes y filtros*. Rechazan la luz del fondo, minimizando la radiación láser no deseada que va hacia el detector.
- d) *Detectores*. Consta de 2 detectores de dispersión (*FSC* con un ángulo menor de  $10^\circ$  para detectar la luz emitida por la interacción célula-haz, y *SSC* que al ser más sensible detecta la emisión a ángulos entre  $10^\circ$  y  $90^\circ$ ) y 4 detectores de fluorescencia.
- e) *Sistema electrónico*. Las señales recibidas se amplifican y se convierten en una señal digital manejable desde un ordenador.<sup>65</sup> La estación de trabajo que se utiliza es *BD FACStation<sup>TM</sup>* con un ordenador *MacPro* que contiene el paquete *Software CellQuest Pro* para el análisis y gestión de los datos. Los resultados, se obtienen de modo automático, de forma rápida y precisa, con un elevado rendimiento de adquisición, con la posibilidad de crear gráficas, puertas, análisis estadísticos y una presentación de informes. El tiempo de adquisición depende de la concentración celular y del número total de células.<sup>66</sup>



**Figura 2.16.** Esquema del equipo BD FACSCalibur.

### 2.3.8. MEDIDA DE LA CITOTOXICIDAD (ENSAYO MTT)

La toxicidad celular es una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva un daño, el cuál puede ser detectado.<sup>69</sup> Existen diferentes ensayos clásicos que determinan la citotoxicidad, tales como el de captación del rojo neutro, el enlazamiento al azul de Kenacid, y la reducción del Bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).<sup>70</sup> El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico y luminiscente que permite medir las muestras directamente en una placa por medio de la utilización de un



lector microplaca de 96 pocillos o de un lector de placa *ELISA*. Con esta microplaca se pueden analizar muchas muestras de manera rápida y simultánea. Es un lector económico, de alto rendimiento y con configuraciones flexibles.

El método *MTT*, desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado por Francois Denizoz y Rita Lang en 1986,<sup>71</sup> evaluó la proliferación celular, la viabilidad celular y la citotoxicidad.

Los ensayos *in vitro* de citotoxicidad son capaces de detectar cualquier efecto adverso producido en la estructura celular (interna y externa) y en sus propiedades, esenciales para la supervivencia y proliferación celular.<sup>69</sup> El lector de microplacas permite detectar eventos bioquímicos, químicos y físicos, para descubrir fármacos, validar bioensayos, hacer controles de calidad y procesos de fabricación en la industria farmacéutica y biotecnológica.<sup>72-75</sup> El modo normal para estos ensayos es: medida de absorbancia, intensidad de fluorescencia, luminescencia, fluorescencia resuelta en el tiempo y fluorescencia de polarización.<sup>71</sup> En esta Tesis se ha utilizado la *detección de absorbancia* cuyo método se utiliza para el análisis *ELISA*, para la cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos y para ensayos de actividad enzimática, como es el ensayo *MTT* que estudia la viabilidad celular. Mide el % de la luz inicial (100%) que se transmite a través de la muestra, cuyo valor está relacionado con la concentración de la molécula de interés. El ensayo de reducción del *MTT* es un método simple que determina la viabilidad celular dada por el número de células presentes en el cultivo, las cuáles se miden mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que sucede en las mitocondrias de las células viables.<sup>72</sup> El *MTT* es captado por las células y reducido por la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble. Las células se adhieren a los anillos de tetrazolio y forman los cristales morados de *formazan* que son insolubles en disolución acuosa. El *formazan* queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas, permitiendo cuantificar la cantidad de *MTT* reducido por medio de un estudio colorimétrico, ya que debido a su reducción cambia de amarillo a azul. La formación de *formazan* significa que la mitocondria se encuentra intacta.

La capacidad de las células para reducir el *MTT*, indica la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, y da la medida de la viabilidad celular y de la toxicidad, es decir, se puede cuantificar las células que son activas metabólicamente.<sup>73</sup> Un aumento del número de células produce un aumento de la cantidad de *formazan MTT* formado, lo que implica un aumento de la absorbancia detectada.

El % de viabilidad celular se determina con un espectrofluorímetro a una longitud de onda entre 500-600 nm (la absorbancia máxima depende del disolvente utilizado). Los resultados se expresan como % de células vivas:

$$\%viabilidad = \frac{A_{592} - A_{592control(DMSO)}}{A_{592controlcelular} - A_{592control(DMSO)}} \times 100 \quad (2.15)$$

Se debe utilizar un control del medio celular no tratado (*% vida celular* > 1), un control positivo (sustancia con citotoxicidad conocida) y otro negativo (el disolvente). Las medidas se hacen por triplicado.<sup>71,76</sup>

La curva dosis-respuesta se calcula a partir del intervalo de concentración utilizado y la % de reducción del crecimiento celular. Se debe calcular la concentración a la cuál se produce la reducción de la viabilidad celular en un 50 %, es decir, los valores de comparación se hacen sobre una base del 50 % de inhibición del crecimiento (*IC<sub>50</sub>*) en las células tratadas con los agentes específicos. A partir de la curva dosis-respuesta se deduce la efectividad del agente en causar la muerte o en cambiar el metabolismo de las células. Para ello se compara la cantidad de *formazan* morado producido por las células tratadas con un agente con otras células no tratadas que actúan de control.

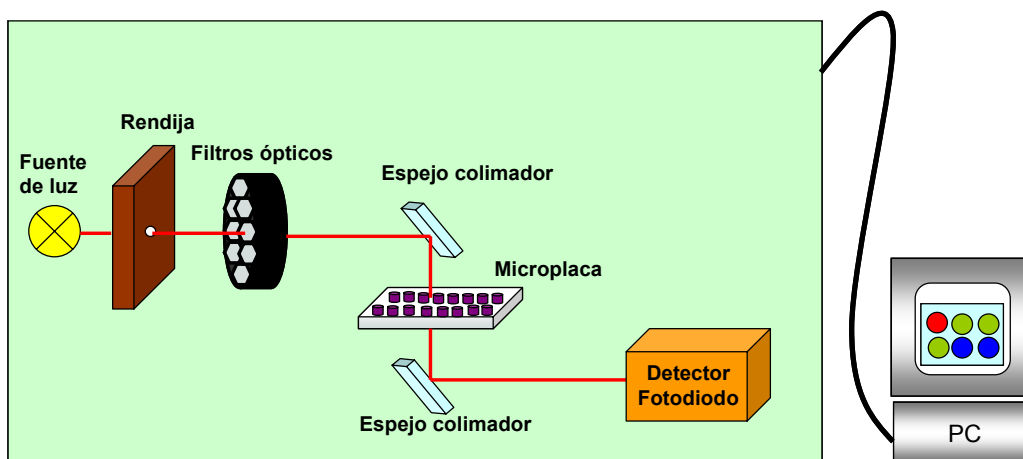
El equipo que se utilizó para determinar la viabilidad celular y con ello la citotoxicidad, fue el *MTT-BioRAD modelo 680-Microplate Analyzer*, ubicado en el IISc, Bangalore (India).

Con esta técnica colorimétrica se mide la absorbancia de la disolución coloreada formada por las células que contienen los lipoplejos y el *MTT*, a una determinada longitud de onda (400-750 nm).

El equipo, cuyo esquema se muestra en la figura 2.17, consta de:

- a) *Fuente*. Fuente de halógeno tungsteno de 20 W de potencia.
- b) *Filtros*. Contiene 8 filtros posicionados en un carrusel, que posibilitan elegir la longitud de onda con la que se va a incidir la muestra.
- c) *Microplaca de cultivo*. Fabricada en plástico con 96 pocillos en donde se depositan los controles positivos, los negativos y las muestras (células incubadas con los lipoplejos y *MTT*) en función del tiempo de cultivo (6, 24 y 48 horas).
- d) *Detectores*. 8 detectores fotodiodo de silicona que transforman la radiación obtenida de la muestra en una señal eléctrica.<sup>77</sup> Tras la amplificación y lectura de la señal eléctrica, se transfieren los resultados a un ordenador.

Esta técnica presenta una calibración automática antes de comenzar cada medición.



**Figura 2.17.** Esquema de un Espectrofotómetro para medir absorbancia del MTT oxidado en un cultivo celular con lipoplejos.

## 2.4. MODELOS TEÓRICOS

### 2.4.1. MODELO TEÓRICO DE AGREGACIÓN-DESAGREGACIÓN

El estudio de las dispersiones coloidales en presencia de contraiones multivalentes desde un punto de vista teórico ha adquirido gran interés en las últimas décadas debido a su aplicación en biofísica. Tal y como se ha detallado en el apartado 1.3.2, la formación de lipoplejos envuelve fenómenos de fuerzas de naturaleza electrostática entre partículas cargadas (liposomas) y contraiones multivalentes (DNA). Como consecuencia de la interacción entre las superficies cargadas, se puede llegar a la conclusión de que, si la concentración de contraiones en los alrededores de la superficie llega a ser tal que la carga de los iones es mayor que la carga de la superficie, se pueden producir fenómenos de sobrecarga.<sup>78</sup> Comúnmente este fenómeno de sobrecarga se le conoce como inversión de carga, cuyo requisito es la existencia de la interacción entre las superficies cargadas (iones o macroiones) por efecto de su carga y de su volumen, o, de otra manera, la existencia de *correlación* en carga y en tamaño.<sup>78</sup> La teoría clásica de la interfase electrificada, basada en la ecuación de Poisson-Boltzmann (*PB*), no tiene en cuenta el tamaño de los iones (al considerarlos puntuales), de manera que no es capaz de describir adecuadamente los fenómenos de correlación entre iones de gran tamaño. Recientemente *Shklovskii* y col.<sup>79-81</sup> han desarrollado una teoría, conocida como la *teoría de agregación-desagregación* o de *condensación-condensación reentrante*, capaz de explicar estos fenómenos de correlación entre iones multivalentes. En presencia de un macroión cargado, los contraiones tienden a situarse en las proximidades de su superficie, dando lugar a una estructura bidimensional

denominada *crystal fuertemente correlacionado (SCL)*.<sup>78,82</sup> Debido a las correlaciones entre los contraiones que forman el *SCL*, el potencial químico asociado a esta estructura produce una interacción atractiva superficie-ión, que hace que se atraigan más contraiones de los necesarios para neutralizar la carga del macroión. Es decir, cuando un contraión se aproxima a la superficie cargada del macroión, aparece una repulsión entre éste y los iones que forman parte del *SCL*, dando lugar a la creación de un hueco de carga opuesta que lo atrae hacia la superficie.<sup>78</sup> Si bien la teoría obtiene buenos resultados, también presenta una serie de limitaciones, entre las que destaca que sólo tiene en cuenta las correlaciones de corto alcance entre contraiones que forman parte del *SCL*, si bien el resto de la atmósfera iónica es tratada por la *teoría de Poisson-Boltzmann*.<sup>78,82</sup>

Teniendo en cuenta estas limitaciones, *Shklovskii* y col.<sup>83-85</sup> han aplicado la teoría a sistemas complejos constituidos por la interacción de grandes polielectrolitos negativos y muchas partículas esféricas cargadas positivamente. Sus estudios se han centrado en los fenómenos de sobrecarga de macroiones esféricos por la interacción de poli-iones de carga opuesta, considerando el caso válido para esferas cuyo tamaño es más pequeño que la longitud total del poli-ión o, en otras palabras, el poli-ión es tan largo que puede formar complejos con muchas partículas de carga opuesta. A partir de estos trabajos, *Sennato* y col.<sup>86</sup> han modificado la teoría para el caso opuesto, cuando los poli-iones se adsorben en la superficie de las partículas contribuyendo al apantallamiento parcial de la misma, dando lugar a la formación de un complejo en el que cada esfera está interaccionando con varias cadenas de poli-iones. Ambos desarrollos teóricos conducen a la determinación del diagrama de fases de los complejos esfera catiónica-polianión.

En esta Tesis se ha aplicado la extensión teórica desarrollada por *Sennato* y col. a los complejos liposoma-DNA. Por similitud se puede considerar a los liposomas como partículas esféricas cargadas positivamente, de radio  $a$  y concentración  $S$ , y las cadenas de DNA como polianiones de longitud  $l_p$  y concentración  $P$ . De este modo, la teoría relaciona la concentración constante de liposomas,  $S$ , con dos concentraciones de DNA,  $P_a(S)$  y  $P_d(S)$ , a las cuales los complejos liposoma-DNA comienzan, respectivamente, a condensar formando “*clusters*” o aglomerados de complejos, y a desagregarse, con la consiguiente ruptura del “*cluster*”. Para  $P < P_a(S)$  los fragmentos de DNA permanecen en el medio y los liposomas forman complejos con carga global positiva pero menor que las de los liposomas de partida. Cuando la repulsión es progresivamente substituida por la atracción, los complejos se agregan, lo que sucede cuando  $P_a(S) < P < P_d(S)$ . Para  $P > P_d(S)$  los

liposomas están sobrecargados con poli-iones formando de nuevo los complejos, esta vez con carga neta negativa. Entre  $P_a(S)$  y  $P_d(S)$  el sistema sufre un proceso de inversión de carga, como consecuencia de la adición en exceso de uno de los dos componentes del complejo. Este suceso tiene lugar a una determinada concentración de DNA,  $P_\phi(S)$ , a la cual el sistema está completamente condensado y los “clusters” adquieren mayoritariamente neutralidad electrónica, manifestada en la pérdida de la estabilidad coloidal. La teoría describe las ecuaciones que definen  $P_a(S)$ ,  $P_d(S)$  y  $P_\phi(S)$ , con las que se puede construir el diagrama de fases del sistema. A continuación se detallan los fundamentos que conducen a dichas ecuaciones.

Teniendo en cuenta la elevada atracción que existe entre los liposomas, cargados positivamente, y las hélices de DNA, cargadas negativamente, es fácil entender que en disolución estas últimas tiendan a adsorberse en la superficie de los liposomas. Como resultado, cada liposoma catiónico está apantallado por  $N$  segmentos de DNA, de manera que el complejo formado tendrá una carga,  $Q_c$ :

$$Q_c = Q_s - NQ_p \quad (2.16)$$

donde  $Q_s$  y  $Q_p$  son las cargas del liposoma y del DNA respectivamente. En el punto de neutralización de carga del liposoma se debe cumplir la relación:

$$Q_s - N_\phi Q_p = 0 \quad (2.17)$$

donde  $N_\phi (=Q_s/Q_p)$  es el número de segmentos de DNA que se necesitan para neutralizar un liposoma. Así, la *energía libre de un complejo*, formado por un liposoma y  $N$  fragmentos de DNA, se define como:

$$f(N) = \frac{Q_c^2}{2C} + NE(N) \quad (2.18)$$

El primer término de esta ecuación es la energía electrostática de un complejo esférico de radio  $R \approx a$ , carga  $Q_c$  y capacitancia  $C = 4\pi R\epsilon_0\epsilon$ . El segundo término ( $NE(N)$ ) es la energía de correlación que da cuenta de la interacción de un liposoma con las cadenas de DNA interaccionando alrededor de él.

Por otro lado, si  $x$  es la fracción de liposomas que forman parte de los “clusters” de complejos, la concentración de complejos libres en disolución es:

$$C_{c,free} = (1-x)S \quad (2.19)$$

De igual manera, la concentración de DNA libre en disolución es:

$$P_{free} = P - xSN_{\phi} - (1-x)SN \quad (2.20)$$

donde  $xSN_{\phi}$  es la concentración de fragmentos de DNA que forman parte del “cluster” macroscópico neutro, y  $(1-x)SN$  es la concentración de fragmentos de DNA interaccionando con los complejos liposoma-DNA.

Así, las ecuaciones 2.18 y 2.19 permiten definir la *energía libre de los complejos* (formados por un liposoma y  $N$  cadenas de DNA),  $F_c(N,x)$ , como:

$$F_c(N,x) = (1-x)S \cdot f(N) \quad (2.21)$$

mientras que la *energía libre de los fragmentos de DNA libres* en disolución,  $F_p(N,x)$ , puede escribirse como:

$$F_p(N,x) = kTP_{free} \ln \left[ \frac{P_{free} v_0}{e} \right] = kT \left( P - xSN_{\phi} - (1-x)SN \right) \times \ln \left[ \frac{\left( P - xSN_{\phi} - (1-x)SN \right) v_0}{e} \right] \quad (2.22)$$

La teoría asume que la concentración de fragmentos de DNA libre,  $P_{free}$ , es muy pequeña, de manera que la disolución de cadenas de DNA puede considerarse ideal, con volumen normalizado  $v_0$ .<sup>85</sup>

Finalmente, la *energía libre de los “clusters”*,  $F_a(N,x)$ , puede ser escrita como:

$$F_a(N,x) = xS \left[ N_{\phi} E(N_{\phi}) + N_{\phi} E_0 \right] \quad (2.23)$$

donde  $N_{\phi} E(N_{\phi})$  es la energía de correlación de un liposoma con las  $N_{\phi}$  cadenas de DNA interaccionando alrededor de él para formar un complejo neutro, y  $N_{\phi} E_0$  es la energía por complejo ganada en la formación de los “clusters” (comparada con un complejo liposoma-DNA neutro no agregado). Esta última energía se origina de la correlación inducida por la atracción a corto alcance entre los complejos, siendo  $E_0$  la energía de unión por complejo en un “cluster”.

La suma de las tres energías libres expresadas constituye la energía libre del sistema:

$$\begin{aligned} F(N,x) &= F_c(N,x) + F_a(N,x) + F_p(N,x) = \\ &= (1-x)S \cdot f(N) + xSN_{\phi} \left[ E(N_{\phi}) + E_0 \right] + \\ &\quad kT \left( P - xSN_{\phi} - (1-x)SN \right) \times \ln \left[ \frac{\left( P - xSN_{\phi} - (1-x)SN \right) v_0}{e} \right] \end{aligned} \quad (2.24)$$

cuya minimización con respecto a la fracción  $x$  de DNA en los “clusters” y con respecto al número  $N$  de segmentos de DNA que forman parte de los complejos liposoma-DNA, resulta en las siguientes ecuaciones, respectivamente:

$$kT \ln \left[ \left( P - xSN_\phi - (1-x)SN \right) v_0 \right] = \mu_c(N) + \frac{Q_s Q_c}{C} \quad (2.25)$$

$$N_\phi E_0 = \frac{Q_c^2}{2C} + (N_\phi - N) \times \left( kT \ln \left[ \left( P - xSN_\phi - (1-x)SN \right) v_0 \right] - \mu_c(N_\phi) \right) \quad (2.26)$$

La ecuación 2.25 equipara el potencial químico de los fragmentos de DNA libres (primer miembro) y el potencial químico de los fragmentos de DNA asociados al complejo (segundo miembro). Aquí  $Q_c/C$  es el potencial electrostático medio en la superficie del complejo y  $\mu_c(N)$  ( $= \partial[NE(N)]/\partial N < 0$ ) es la contribución al potencial químico debido a la correlación del DNA en el complejo. La ecuación 2.26 es la condición de equilibrio para los complejos neutros e iguala la energía de unión por complejo en los “cluster” (primer miembro) y el potencial químico de un complejo liposoma-DNA libre (segundo miembro).

Si se define una concentración  $P_0$  de segmentos de DNA que está en equilibrio con los complejos liposoma-DNA como:

$$P_0 = \frac{1}{v_0} \exp \left( -\mu_c(N_\phi) / kT \right) \quad (2.27)$$

se puede reescribir la ecuación 2.25 como:

$$kT \ln \left[ \frac{\left( P - xSN_\phi - (1-x)SN \right)}{P_0} \right] = \left( \frac{N}{N_\phi} - 1 \right) \frac{Q_s Q_p}{C} \quad (2.28)$$

De esta ecuación, se puede ver que cuando la concentración de DNA libre,  $(P - xSN_\phi - (1-x)SN)$ , es mayor que la concentración  $P_0$ ,  $(N/N_\phi - 1)$  es negativo, indicando un efecto de inversión de carga. Debido a que la interacción coulombiana entre fragmentos de DNA es mucho más grande que la energía térmica,  $|\mu_c(N_\phi)| \gg kT$ ,  $P_0$  es una concentración exponencialmente muy pequeña. También se puede observar cómo, en ausencia de correlaciones,  $\mu_c = 0$ ,  $P_0 = 1/v_0$ , y la inversión de carga nunca puede observarse.

A partir de la ecuación 2.25 y asumiendo que la carga de un complejo en la región próxima a la agregación (formación del “cluster”) es aproximadamente cero ( $\mu_c(N) \approx \mu_c(N_\phi)$ ), la ecuación 2.26 puede escribirse como:

$$|E_0| = \left( \frac{N}{N_\phi} - 1 \right)^2 \frac{Q_s Q_p}{2C} \quad (2.29)$$

Las ecuaciones 2.28 y 2.29 constituyen la base misma de la teoría. Ambas contienen únicamente dos parámetros fenomenológicos,  $P_0$  y  $E_0$ . La primera ecuación describe la intensidad de la atracción a corto alcance entre complejos, mientras que la segunda describe la intensidad de la asociación liposoma-DNA.

En el caso de que la concentración de liposomas  $S$  sea muy pequeña, la ecuación 2.29 puede escribirse como:

$$\frac{|E_0|}{kT} = \frac{kTC}{2Q_s Q_p} \ln^2 \left( \frac{P}{P_0} \right) \quad (2.30)$$

cuyas dos soluciones,  $P_a$  y  $P_d$ , son:

$$P_{a,d} = P_0 \exp \left( \mp \frac{1}{kT} \sqrt{\frac{2Q_s Q_p |E_0|}{C}} \right) \quad (2.31)$$

La solución negativa,  $P_a < P_0$ , corresponde a la concentración de DNA a la cual los complejos liposoma-DNA cargados negativamente comienzan a agregarse para formar “clusters”, mientras que la solución positiva,  $P_d > P_0$ , corresponde a la concentración de DNA a la cual los “clusters” se desagregan para formar complejos liposoma-DNA libres en la disolución. Sin embargo, existe una dependencia de  $P_a$  y  $P_d$  con la concentración de liposomas  $S$ . Debido a que  $E_0$  es constante, la ecuación 2.29 demuestra que, en el régimen de coexistencia de los “clusters” y los complejos libres,  $N$  es una constante con respecto a  $S$  y a  $P$ :

$$N_{a,d} = N_\phi \left( 1 \mp \sqrt{\frac{2|E_0|C}{Q_s Q_p}} \right) \quad (2.32)$$

Por otro lado la ecuación 2.28 permite llegar a la conclusión de que en el régimen de coexistencia, la concentración de DNA libre,  $P_{free}$ , es una constante independiente de  $S$ . Así, para las transiciones de agregación y desagregación de los “cluster” se obtiene:

$$P(S, x) - xSN_\phi - (1-x)SN_a = P_a \quad (2.33)$$

$$P(S, x) - xSN_\phi - (1-x)SN_d = P_d \quad (2.34)$$

Ahora, se pueden encontrar fácilmente las concentraciones  $P_a(S)$  (donde los complejos liposoma-DNA comienzan a agregarse) y  $P_d(S)$  (donde los “clusters” se



desagregan). Dado que a estas concentraciones se puede considerar que la fracción de liposomas en los “clusters” es  $x = 0$ , las ecuaciones 2.33 y 2.34 quedan:

$$P_a(S) = P_a + SN_a \quad (2.35)$$

$$P_d(S) = P_d + SN_d \quad (2.36)$$

La conveniente sustitución de las ecuaciones 2.31 y 2.32 en las ecuaciones 2.35 y 2.36 permite obtener, finalmente, las concentraciones de agregación y desagregación de DNA que definen la región de existencia de los “clusters”:

$$P_a(S) = P_0 \exp\left(-\frac{1}{kT} \sqrt{\frac{2Q_s Q_p |E_0|}{C}}\right) + S \frac{Q_s}{Q_p} \left(1 - \sqrt{\frac{2C|E_0|}{Q_s Q_p}}\right) \quad (2.37)$$

$$P_d(S) = P_0 \exp\left(\frac{1}{kT} \sqrt{\frac{2Q_s Q_p |E_0|}{C}}\right) + S \frac{Q_s}{Q_p} \left(1 + \sqrt{\frac{2C|E_0|}{Q_s Q_p}}\right) \quad (2.38)$$

Por otro lado, la ecuación que define la concentración de DNA en la electroneutralidad, a la cual el “cluster” es eléctricamente neutro, puede calcularse sustituyendo  $N$  por  $N_\phi$  en la ecuación 2.28, lo que da lugar a:

$$P_\phi(S) = P_0 + SN_\phi \quad (2.39)$$

La resolución de las ecuaciones 2.37 y 2.38 implica conocer las concentraciones de DNA a las que los complejos comienzan a agregarse y desagregarse,  $P_a(S)$  y  $P_d(S)$ , respectivamente, para lo cual son muy útiles las medidas de movilidad electroforética. Sin embargo, en las medidas electroforéticas realizadas en esta Tesis (ver Anexo) la concentración de DNA se ha mantenido constante, siendo la concentración de liposomas la que varía. En este caso se cumple la igualdad:

$$P = P_a(S) = P_d(S) = P_\phi(S) \quad (2.40)$$

y las ecuaciones 2.37 y 2.38 se pueden reescribir:

$$P = P_0 \exp\left(-\frac{1}{kT} \sqrt{\frac{2Q_s Q_p |E_0|}{C}}\right) + S_d(P) \frac{Q_s}{Q_p} \left(1 - \sqrt{\frac{2C|E_0|}{Q_s Q_p}}\right) \quad (2.41)$$

$$P = P_0 \exp\left(\frac{1}{kT} \sqrt{\frac{2Q_s Q_p |E_0|}{C}}\right) + S_a(P) \frac{Q_s}{Q_p} \left(1 + \sqrt{\frac{2C|E_0|}{Q_s Q_p}}\right) \quad (2.42)$$

donde  $S_a(P)$  y  $S_d(P)$  son, respectivamente, la concentración de liposomas donde los complejos comienzan a agregarse y desagregarse. Nótese el cambio de nomenclatura en la ecuación 2.41 (correspondiente a la desagregación de complejos, cuando se parte de una

concentración de DNA constante) con respecto a la ecuación 2.37 (correspondiente a la agregación de complejos, cuando se parte de una concentración de liposomas constante). Asimismo, la ecuación 2.39 puede reescribirse:

$$P = P_0 + S_\phi(P)N_\phi \quad (2.43)$$

donde  $S_\phi(P)$  es la concentración de liposomas en la electroneutralidad, que conviene expresar también en términos de la relación de masa,  $(L/D)_{\phi,teo}$ :

$$(L/D)_{\phi,teo} = \frac{S_\phi(P)\Phi}{2P\bar{\Lambda}} \left( \frac{\alpha M_{L^+} + (1-\alpha)M_{L^0}}{M_{bp}} \right) \quad (2.44)$$

donde  $\bar{\Lambda}$  es el número promedio de pares de bases por segmento de DNA, determinado a partir de electroforesis en gel de agarosa;  $\Phi$  es el número de lípidos por liposoma, calculado a partir del espesor de la bicapa lipídica, las superficies de las cabezas polares de los lípidos y la superficie de los liposomas mixtos esféricos, a partir de los datos obtenidos por los experimentos de crio-TEM.

El modelo teórico descrito se ha particularizado a lipoplejos constituidos por liposomas (partículas según el modelo) esféricos cuya carga es mayor que la de los poliones y DNA, con el propósito de obtener el diagrama de fases de cada sistema, resolviendo las ecuaciones 2.41 y 2.42 mediante un programa informático de cálculo iterativo, elaborado y puesto a punto en esta Tesis.<sup>13,14,20,82,87,88</sup> El programa permite también obtener los valores de los parámetros fenomenológicos  $P_0$  y  $E_0$ , así como los parámetros característicos de la electroneutralidad,  $S_\phi(P)$  y/o  $(L/D)_{\phi,teo}$ , pudiendo comparar estos últimos con los determinados a partir de las distintas técnicas experimentales utilizadas.

#### 2.4.1.1. Renormalización de cargas.

Aunque el modelo de complejación de *Nguyen* y *Shklovskii* presentado en el apartado anterior describe cualitativamente bien los resultados experimentales, *Sennato* y colaboradores pusieron de manifiesto que esta descripción teórica puede ser sustancialmente mejorada si se tiene en cuenta en el cálculo el efecto de condensación de contraiones de *Manning*.<sup>89-92</sup> Este efecto, que ya ha sido extensivamente analizado en estudios de simulación del fenómeno de adsorción de polielectrolitos sobre partículas cargadas,<sup>89-92</sup> se puede introducir en el modelo anteriormente descrito si se trabaja con cargas teóricas renormalizadas tanto para los liposomas ( $Q_{S,ren}$ ) como para los fragmentos

de DNA ( $Q_{P,ren}$ ), en vez de hacerlo con cargas nominales que consideran una total ionización de los grupos cargados de ambos.<sup>86</sup>

En el caso de la renormalización de la carga del liposoma, el modelo de *Sennato* propone una expresión que depende de la fracción en volumen del liposoma. Este cálculo de las cargas renormalizadas puede incluso mejorarse con el modelo *jellium*, ya utilizado con éxito para estimar cargas renormalizadas en liposomas y partículas de látex.<sup>87,93</sup> La idea esencial consiste en trabajar con la teoría clásica de la estabilidad coloidal (*teoría DLVO*) para predecir el potencial efectivo de interacción entre dos partículas coloidales, pero utilizando cargas renormalizadas en lugar de las cargas nominales. El procedimiento de cálculo está recogido con detalle en las referencias citadas y comienza básicamente con el uso de la ecuación de *Poisson-Boltzmann* para el cálculo del potencial electrostático renormalizado en términos de cargas nominales de las partículas coloidales. La ecuación diferencial de segundo orden que resulta se resuelve, junto con las condiciones de contorno, a distancia infinita (donde se anula el potencial) y a una distancia igual al radio de la partícula, aplicando las *leyes de Gauss*. La solución de campo lejano de esta ecuación se coteja con la solución de la ecuación de *PB* linealizada en la que se utiliza  $Q_{S,ren}$  en lugar de  $Q_S$ .

En el caso de la carga del DNA, se ha empleado el mismo protocolo general que utiliza *Sennato y col.* para renormalizar las cargas de un poli-ión cargado:

$$Q_{P,ren} \sim l|e|/l_B \quad (2.45)$$

donde  $l$  es la longitud promedio del fragmento de DNA, y  $l_B$  es la longitud de *Bjerrum* ( $l_B = e^2/(4\pi\epsilon_0\epsilon k_B T)$ ).<sup>86</sup>

En cuanto a la metodología, los valores de los volúmenes parciales del liposoma, calculados sabiendo que en el volumen total hay que tener en cuenta el volumen del DNA y del medio, se introducen en el nuevo programa que opera con las ecuaciones del modelo *jellium* y se obtienen los datos de  $S_a$  y  $S_d$  teóricos, a partir de los cuales se calculan los valores de  $S_\phi(P)$  y de  $(L/D)_\phi$  teóricos en la electroneutralidad.

## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bhattacharya, S.; Bajaj, A. *Chem. Commun.* **2009**, 4632.
- (2) Feitosa, E.; Alves, F. R.; Niemiec, A.; Oliveira, M.; Castanheira, E. M. S.; Baptista, A. L. F. *Langmuir* **2006**, *22*, 3579.
- (3) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Acad./Plenum: New York, **1999**.
- (4) Eastman, S. J.; Siegel, C.; Tousignant, J.; Smith, A. E.; Cheng, S. H.; Scheule, R. K. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1325*, 41.
- (5) Xu, Y. H.; Hui, S. W.; Frederik, P.; Szoka, F. C. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 341.
- (6) Tarahovsky, Y. S.; Koynova, R.; MacDonald, R. C. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1054.
- (7) MacDonald, R. C.; Ashley, G. W.; Shida, M. M.; Rakhmanova, V. A.; Tarahovsky, Y. S.; Pantazatos, D. P.; Kennedy, M. T.; Pozharski, E. V.; Baker, K. A.; Jones, R. D.; Rosenzweig, H. S.; Choi, K. L.; Qiu, R.; McIntosh, T. J. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2612.
- (8) Regelin, A. E.; Fankhaenel, S.; Gurtesch, L.; Prinz, C.; von Kiedrowski, G.; Massing, U. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1464*, 151.
- (9) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7764.
- (10) Ryhänen, S. J.; Säily, M. J.; Paukku, T.; Borocci, S.; Mancini, G.; Holopainen, J. M.; Kinnunen, P. K. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 578.
- (11) Hirsch-Lerner, D.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1370*, 17.
- (12) Borenstain, V.; Barenholz, Y. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 117.
- (13) Muñoz-Úbeda, M.; Rodríguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Llorca, O.; Quesada-Pérez, M.; Martín-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Soft Matter* **2011**, *7*, 5991.
- (14) Muñoz-Ubeda, M.; Rodríguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Martín-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3332.
- (15) Bajaj, A.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 991.
- (16) Muñoz-Úbeda, M.; Misra, S. K.; Barrán-Berdón, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Sierra, M. B.; Biswas, J.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18014.
- (17) Lasic, D. D. *Liposomes in Gene Delivery*; CRC Press: Boca Raton, FL, **1997**.
- (18) Rodríguez-Pulido, A.; Ortega, F.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12555.
- (19) Rodríguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Llorca, O.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2187.
- (20) Rodríguez-Pulido, A.; Martín-Molina, A.; Rodríguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648.
- (21) Pereira-Lachataignerais, J.; Pons, R.; Panizza, P.; Courbin, L.; Rouch, J.; Lopez, O. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *140*, 88.
- (22) Ciani, L.; Ristori, S.; Calamai, L.; Martini, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1664*, 70.
- (23) Gonçalves, E.; Debs, R. J.; Heath, T. D. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1554.
- (24) Salvati, A.; Ciani, L.; Ristori, S.; Martini, G.; Masi, A.; Arcangeli, A. *Biophys. Chem.* **2006**, *121*, 21.
- (25) Hunter, R. J. *Zeta Potential in Colloids Science. Principles and Applications*; Academic Press: London, **1981**.
- (26) Delgado, A. V. *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*; Marcel Dekker: New York, **2002**; Vol. 106.
- (27) Ohshima, H.; Furusawa, K. *Electrical Phenomena at Interfaces. Fundamentals, Measurements, and Applications*; Marcel Dekker: New York, **1998**.
- (28) von Smoluchowski, M. *Zeitschrift für Physikalische Chemie (Munich)* **1918**, *92*, 129.
- (29) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Principios de Bioquímica*, 3 ed. Barcelona, **2001**.
- (30) Stryer, L.; Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. *Bioquímica*, 5 ed. Barcelona, **2003**.
- (31) Protocolo de BioRad que acompaña al "Quantum Prep Miniprep Kit".
- (32) Royer, C. A. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 1191.
- (33) Birchall, J. C.; Kellaway, I. W.; Mills, S. N. *Int. J. Pharm.* **1999**, *183*, 195.

- (34) Karukstis, K. K.; Zieleniuk, C. A.; Fox, M. J. *Langmuir* **2003**, *19*, 10054.
- (35) Manoj, K. M.; Jayakumar, R.; Rakshit, S. K. *Langmuir* **1996**, *12*, 4068.
- (36) Asakawa, T.; Mouri, M.; Miyagishi, S.; Nishida, M. *Langmuir* **1989**, *5*, 343.
- (37) Karukstis, K. K.; McCormack, S. A.; McQueen, T. M.; Goto, K. F. *Langmuir* **2004**, *20*, 64.
- (38) Williams, D. B. *Transmission Electron Microscopy*; Plenum Press: New York, **1996**; Vol. Basic I.
- (39) Gómez-Moreno Calera, C.; Sancho Sanz, J. *Estructura de Proteínas*; Ariel: Barcelona, **2003**.
- (40) Ludtke, S. J.; Baldwin, P. R.; Chiu, W. J. *Struct. Biol.* **1999**, *128*, 82.
- (41) Renau, J.; Megías, L. *Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.)*, **1998**.
- (42) Minsk, M. *U.S. Pat.* **1957**, *3*, 13.
- (43) Petran, M.; Hadravsky, M.; Egger, D.; Galambos, R. *J. Opt. Soc. Am.* **1968**, *58*, 660.
- (44) Art, J. J.; Goodman, M. B. *Rapid Scanning Confocal Microscopy. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*, **1993**.
- (45) Boyde, A. *Microscopy and analysis* **1988**, *7*.
- (46) Wright, S. J.; Entezone, V. E.; Stricker, S. A.; DeVries, P. J.; Paddock, S. W.; Schaten, G. *Introduction to Confocal Microscopy and Three-Dimensional Reconstruction. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy.*, **1993**.
- (47) Keller, H. E. *Objective Lens for Confocal Microscopy, Handbook of Biological Confocal Microscopy*, **1995**.
- (48) Stezer, E. H. K. *The Intermediate Optical System of Laser Scanning Confocal Microscopy*, **1995**.
- (49) *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*; Wilson, T.; Shepard, C. J. R., Eds., **1985**.
- (50) Kriete, A. *New Dimensions of Visualization in Microscopy. Visualization in Biomedical Microscopies. 3D Imaging and Computer Applications*. Cambridge UK, **1992**.
- (51) Van der Voort, H. T. M.; Brakenhoff, G. J.; Baarslag. *Journal of Microscopy* **1989**, *153*, 123.
- (52) Webb, R. H.; Dorey, C. K. *The pixelated Image. Handbook of Biological Confocal Microscopy*, **1995**.
- (53) Medidas realizadas en el Dpto. de Química Orgánica, Indian Institute of Science, IISc, Bangalore, India, en colaboración con el grupo del Prof. Santanu Bhattacharya
- (54) Wilson, T.; Carlini, A. R. *Optical Letters* **1987**, *12*, 227.
- (55) Glatter, O.; Kratky, O. *Small-angle X-ray Scattering*. London, **1982**.
- (56) Roux, D.; Safinya, C. R. *J. Physiol.* **1988**, *49*, 307.
- (57) Podgomik, R.; Rau, D. C.; Parsegian, V. A. *Macromolecules* **1989**, *22*.
- (58) Salditt, T.; Koltover, I.; Radler, J. O.; Safinya, C. R. *Phys. Rev. E* **1998**, *58*, 889.
- (59) Medidas realizadas en el Instituto Rocasolano, CSIC (Madrid) en colaboración con Aurora Nogales.
- (60) Medidas realizadas en el ESRF, Beamline 16, Grenoble, Francia.
- (61) Boeff, A.; Lagomarsino, S.; Mazkedian, S.; Melone, S.; Puliti, P.; Rustichelli, F. *J. Appl. Cryst.* **1978**, *11*, 442.
- (62) Franks, A.; Breakwell, P. R. *J. Appl. Cryst.* **1974**, *7*, 122.
- (63) Hendrix, J.; Koch, M. H. J.; Bordas, J. J. *J. Appl. Cryst.* **1979**, *12*, 467.
- (64) Witz, J. *Acta Cryst.* **1969**, *A25*, 30.
- (65) Snyder, E. H. *Hematopoietic Progenitor Stem Cells: A primer for Medical Professionals*, **2000**.
- (66) Castillo, J. L. *Citometría de flujo: Estudio de Laboratorio de Enfermedades Oncohematológicas. Hematología, Fisiopatología y Diagnóstico.*, **2005**.
- (67) Bono, M. R.; Simon, V. *Citometría de Flujo: Principios básicos y Aplicaciones. En Fundamentos de Inmunobiología.*, **1998**.
- (68) Escalante, G. *Manual de citometría de flujo.*, **2006**.
- (69) Repetto, M. *Toxicología Fundamental: Métodos alternativos, toxicidad in vitro*. Sevilla, España, 2002.
- (70) Fentem, J. H. *Human Experimental Toxicology* **1994**, *13*, 445.
- (71) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
- (72) Shayne, G. C. *Alternatives to in vivo studies in toxicology. In: Balomtyne B, Marrs, T. Syversen, T.*, **1999**.

- (73) Jiménez, N.; González, M.; Fernández, C.; López, J. *Biomecánica* **2007**, *15*, 63.
- (74) Van Dyke, K.; Van Dyke, R. *Luminescence Immunoassay and Molecular Applications*. Boca Ratón, Florida, **1990**.
- (75) Permyakov, E. A. *Luminescent Spectroscopy of Proteins* Boca Ratón, Florida, **1993**.
- (76) Denizot, F. L., R. J. *Inmunol. Methods* **1986**, *89*, 271.
- (77) Manual Bio-Rad Laboratories Inc. del Microplate Reader, modelo 680.
- (78) Martín-Molina, A. Propiedades electrocinéticas de sistemas coloidales modelo. Efecto del tamaño iónico., Universidad de Granada, **2003**.
- (79) Perel, V. I.; Shklovskii, B. I. *Physica A* **1999**, *274*, 446.
- (80) Grosberg, A. Y.; Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. *Rev. Modern Phys.* **2002**, *74*, 329.
- (81) Shklovskii, B. I. *Phys. Rev. E* **1999**, *60*, 5802.
- (82) Martín-Molina, A.; Maroto-Centeno, J. A.; Hidalgo-Alvarez, R.; Quesada-Perez, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*.
- (83) Nguyen, T. T.; Rouzina, I.; Shklovskii, B. I. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 2562.
- (84) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 5905.
- (85) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 7298.
- (86) Sennato, S.; Bordi, F.; Cametti, C. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 4936.
- (87) Haro-Perez, C.; Quesada-Perez, M.; Callejas-Fernandez, J.; Shurtenberger, P.; Hidalgo-Alvarez, R. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, *18*, L363.
- (88) La creación, el desarrollo y la utilización del programa informático de cálculo teórico se realizó en el Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides del Dpto. de Física Aplicada de la Univ. de Granada, en colaboración con A. Martín-Molina y M. Quesada-Pérez.
- (89) Tian, W. D.; Ma, Y. Q. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 13161.
- (90) Voulgarakis, N. K.; Rasmussen, K. O.; Welch, P. M. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*.
- (91) Deserno, M.; Jimenez-Angeles, F.; Holm, C.; Lozada-Cassou, M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10983.
- (92) Chodanowski, P.; Stoll, S. *Macromolecules* **2001**, *34*, 2320.
- (93) Haro-Perez, C.; Quesada-Fernandez, M.; Callejas-Fernandez, J.; Sabate, E.; Estelrich, J.; Hidalgo-Alvarez, R. *Colloids Surf. A* **2005**, *270*, 352.



# CAPÍTULO 3

## ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

*En esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo dos tipos de estudios: (a) la caracterización biofísica de dos lipoplejos (DOEPC/DOPE-ctDNA o DC-Chol/DOPE-ctDNA) constituidos con DNA lineal de doble hebra (ctDNA) y un liposoma mixto formado por un lípido catiónico de una cabeza polar (DOEPC o DC-Chol) y un lípido zwitteriónico (DOPE); y (b) la caracterización biofísica y bioquímica de cuatro lipoplejos  $((C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-pDNA$ , siendo  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ ), constituidos con plásmido DNA circular superenrollado (pDNA) y un liposoma mixto formado por un lípido catiónico gemini de dos cabezas polares  $((C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n$  y un lípido zwitteriónico (DOPE). Ambos estudios se han realizado, para cada lipoplejo, a distintas fracciones molares de lípido catiónico,  $\alpha$ , en el liposoma mixto y a varias relaciones de carga efectiva, CR o  $\rho_{eff}$ . Los resultados obtenidos con las diferentes técnicas experimentales utilizadas y con los modelos teóricos aplicados o desarrollados en este trabajo se exponen en formato publicación. El capítulo está dividido en dos apartados: i) lipoplejos con lípidos catiónicos de una cabeza polar, y ii) lipoplejos con lípidos catiónicos gemini de dos cabezas polares. Cada apartado se completa con una discusión final integradora.*





## 3.1. LIPOPLEJOS CON LÍPIDOS CATIÓNICOS DE UNA CABEZA POLAR

### 3.1.1. RESULTADOS

En este apartado se han estudiado los lipoplejos DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA. Para ello se han utilizado diversas técnicas biofísicas para determinar el valor de la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , del lipoplejo, su estructura, forma, tamaño y morfología, así como sus propiedades electroquímicas, micropolaridad y el tipo de interacción que se produce entre el liposoma mixto y el ctDNA. También se ha llevado a cabo un análisis de la estabilidad de estos sistemas empleando un modelo teórico descrito en el apartado 2.4 de esta Memoria.

El objetivo final del estudio biofísico de estos lipoplejos ha sido analizar la influencia que produce en la compactación del DNA en forma de lipoplejos, el tipo de cabeza polar o de la región hidrofóbica del lípido catiónico (CL), la fracción molar del lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y la relación de carga,  $CR$ , entre el lípido catiónico y el DNA. Toda esta información se ha complementado con un análisis del tipo de interacción que se produce entre los liposomas mixtos y el ctDNA y el efecto que produce el DOPE como lípido coadyuvante.

Los resultados experimentales y teóricos se presentan en los dos artículos que se adjuntan a continuación:

**Art.1.** *Effect of Lipid Composition on the Structure and Theoretical Phase Diagrams of DC-Chol/DOPE-DNA Lipoplexes*

M. Muñoz-Úbeda; A. Rodríguez-Pulido; A. Nogales; A. Martín-Molina; E. Aicart; E. Junquera. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3332-3340

**Art.2.** *Gene Vectors Based on DOEPC/DOPE Mixed Cationic Liposomes: a Physicochemical Study*

M. Muñoz-Úbeda; A. Rodríguez-Pulido; A. Nogales; O. Llorca; M. Quesada-Pérez; A. Martín-Molina; E. Aicart; E. Junquera. *Soft Matter* **2011**, *7*, 5991-6004

## Art. 1. Effect of Lipid Composition on the Structure and Theoretical Phase Diagrams of DC-Chol/DOPE-DNA Lipoplexes

M. Muñoz-Úbeda; A. Rodríguez-Pulido; A. Nogales; A. Martín-Molina; E. Aicart; E. Junquera  
*Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3332-3340

En este artículo se ha estudiado la formación de los lipoplejos constituidos por DNA lineal de doble hebra (ctDNA) y un liposoma mixto formado por el lípido catiónico *Cloruro de 3-β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]-colesterol* (DC-Chol) y el lípido zwitteriónico *1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina* (DOPE). El estudio se ha realizado cubriendo todo el intervalo de fracción molar de lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y abarcando una amplia relación de carga,  $CR$ , entre el lípido catiónico y el DNA, en la región donde el liposoma mixto es potencialmente adecuado como vector génico, es decir,  $CR > 1$ . Esta publicación engloba los resultados obtenidos en el inicio de esta Tesis y supone la continuación de un estudio anterior para este mismo sistema en el que sólo se había analizado el comportamiento del lipoplejo para la mezcla equimolecular del liposoma mixto ( $\alpha = 0,5$ ).<sup>1</sup>

Para realizar este estudio se han utilizado una serie de técnicas biofísicas experimentales, como son: (a) la movilidad electroforética o potencial zeta,  $\zeta$ , con la que se ha determinado el valor de  $L/D$  en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , (de gran importancia puesto que es el punto de inflexión a partir del cual cambian muchas propiedades de los nanoagregados), a la vez que se ha analizado el tipo de interacción que se produce entre el liposoma mixto y el ctDNA, (b) la dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), que ha aportado información sobre el tipo de estructura que forma el lipoplejo, así como sus características geométricas, y (c) la anisotropía de fluorescencia,  $r$ , estrechamente relacionada con la fluidez de la bicapa lipídica y la facilidad del lipoplejo en liberar el DNA al ser transfectado a las células vivas.

Por otro lado, también se ha llevado a cabo un análisis mediante un modelo teórico basado en la interacción entre polielectrolitos y partículas esféricas cargadas, recientemente propuesto por primera vez por nuestro grupo para su aplicación a lipoplejos. Este estudio teórico ha permitido construir el diagrama de fases de los lipoplejos. Con este modelo teórico también se ha obtenido el valor de  $(L/D)_\phi$ , el cual ha sido contrastado con el determinado experimentalmente a partir de las medidas electroquímicas del potencial zeta.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar la influencia que tienen en las propiedades estructurales y biofísicas de los lipoplejos, en el grado de compactación del DNA y su potencial transporte mediante este vector liposomal: *i*) la relación lípido-DNA,  $L/D$ , *ii*) el valor de  $L/D$  en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , del lipoplejo, *iii*) la fracción molar del lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y *iv*) la relación de carga,  $CR$ , entre el lípido catiónico y el DNA. El conjunto de resultados obtenidos apuntan a que el liposoma mixto DC-Chol/DOPE constituye un vector coloidal potencialmente adecuado para la transfección del DNA.

# Effect of Lipid Composition on the Structure and Theoretical Phase Diagrams of DC-Chol/DOPE-DNA Lipoplexes

Mónica Muñoz-Úbeda,<sup>†</sup> Alberto Rodríguez-Pulido,<sup>‡</sup> Aurora Nogales,<sup>§</sup>  
Alberto Martín-Molina,<sup>||</sup> Emilio Aicart,<sup>†</sup> and Elena Junquera<sup>\*†</sup>

*Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain, Department of Polymer Chemistry, Zernike Institute for Advanced Materials, University of Groningen, Nijenborgh 4, Groningen, 9747 AG Netherlands, Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, Serrano 121, 28006 Madrid, Spain, and Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071-Granada, Spain*

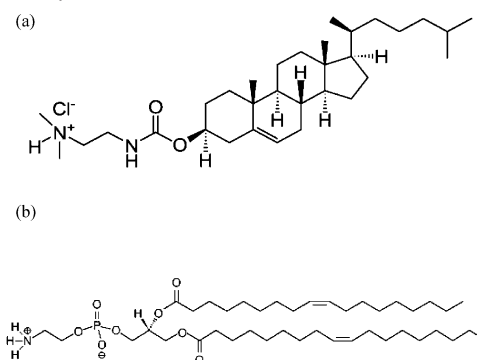
Received July 19, 2010; Revised Manuscript Received October 8, 2010

Lipoplexes constituted by calf-thymus DNA (CT-DNA) and mixed cationic liposomes consisting of varying proportions of the cationic lipid 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride (DC-Chol) and the zwitterionic lipid, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) have been analyzed by means of electrophoretic mobility, SAXS, and fluorescence anisotropy experiments, as well as by theoretically calculated phase diagrams. Both experimental and theoretical studies have been run at several liposome and lipoplex compositions, defined in terms of cationic lipid molar fraction,  $\alpha$ , and either the mass or charge ratios of the lipoplex, respectively. The experimental electrochemical results indicate that DC-Chol/DOPE liposomes, with a mean hydrodynamic diameter of around (120  $\pm$  10) nm, compact and condense DNA fragments at their cationic surfaces by means of a strong entropically driven electrostatic interaction. Furthermore, the positive charges of cationic liposomes are compensated by the negative charges of DNA phosphate groups at the isoneutrality  $L/D$  ratio, ( $L/D$ )<sub>0</sub>, which decreases with the cationic lipid content of the mixed liposome, for a given DNA concentration. This inversion of sign process has been also studied by means of the phase diagrams calculated with the theoretical model, which confirms all the experimental results. SAXS diffractograms, run at several lipoplex compositions, reveal that, irrespectively of the lipoplex charge ratio, DC-Chol/DOPE-DNA lipoplexes show a lamellar structure,  $L_{\alpha}$ , when the cationic lipid content on the mixed liposomes  $\alpha \geq 0.4$ , while for a lower content ( $\alpha = 0.2$ ) the lipoplexes show an inverted hexagonal structure,  $H_{II}$ , usually related with improved cell transfection efficiency. A similar conclusion is reached from fluorescence anisotropy results, which indicate that the fluidity on liposome and lipoplexes membrane, also related with better transfection results, increases as long as the cationic lipid content decreases.

## Introduction

Nowadays, lipoplexes (cationic lipids + DNA) are an increasing area of research because mixed liposomes, formed by cationic and zwitterionic helper lipids, are revealing as the most promising nonviral vectors in gene therapy.<sup>1–8</sup> It is well-known that the efficiency of DNA transfection using cationic lipids is improved by the presence of a neutral helper lipid<sup>4,6,9</sup> and it is highly dependent on the kind of the cationic and the helper lipid, the mixed lipid composition, and the lipid/DNA ratio.<sup>4,6,9</sup> However, a universal behavior can be reached for the lamellar phase when the transfection efficiency is compared with respect to charge density of the mixed liposomes.<sup>10,11</sup> From those previous studies, it is clear that the electrostatic interaction between cationic liposomes and anionic DNA plays an important role in the lipoplex properties, which reinforces the interest on improving the knowledge of this interaction from both experiments and theory.<sup>6,9</sup> In this sense, a physicochemical study of

**Scheme 1.** (a) Cationic Lipid Molecule, DC-Chol, and (b) Zwitterionic Lipid Molecule, DOPE



the DNA compaction by cationic lipids should shed light, not only on the formation process of lipoplexes, but also on the transfection mechanisms.

Lipoplexes formed by a cationic lipid derived from cholesterol (DC-Chol, see Scheme 1) and a zwitterionic helper lipid of the phosphatidylethanolamine family (DOPE, see Scheme 1) have been studied elsewhere not only from a biological standpoint,<sup>12–21</sup> but also from a physicochemical point of view.<sup>22–28</sup> In fact, DOPE is frequently used in transfection because it increases

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +34-913944131. Fax: +34-913944135. E-mail: junquera@quim.ucm.es. <http://www.ucm.es/info/coloidal/index.html>.

<sup>†</sup> Universidad Complutense de Madrid.

<sup>‡</sup> University of Groningen.

<sup>§</sup> Instituto de Estructura de la Materia.

<sup>||</sup> Universidad de Granada.

the elasticity of liposome bilayer and promotes the fusion of lipoplexes with the cell membrane, which results in an increase of the DNA transfection efficiency.<sup>4,11,22,29–35</sup> In addition, we reported recently<sup>28</sup> an experimental study of DNA compaction with the mixed liposome DC-Chol/DOPE at equimolar lipid composition. However, the charge density at the surface and the composition of the mixed liposome, as well as their structural characteristics, seem to be key factors on the properties of the resulting lipoplexes, and, accordingly, on their potential efficiency as cell transfectors.<sup>5,11</sup> In fact, cationic lipoplexes may form lamellar, hexagonal, or even cubic structures, that interact with the cell membranes in a very different way and with a different effectiveness; it has been reported that hexagonal phases promote better transfection yields.<sup>5,11</sup> Thus, it results of relevance to conjugate the capacity of liposomes to condense and compact DNA by forming strong and stable lipoplexes, with a relative ease to release DNA into the cells. Therefore, given that factors such as the lipid composition and the charge ratio of the lipoplex seem to be of great importance, in the present work we report a more extensive study of this lipoplex covering the whole range of the mixed lipid composition and at several lipid/DNA charge ratios. Thus, the objective and the main contribution of this work are to experimentally analyze in depth and to predict, from a theoretical standpoint, the influence of these factors on the compaction process and on the behavior of the DC-Chol/DOPE-DNA lipoplexes.

To carry on this study, the lipoplexes have been characterized by means of several experiments. Electrochemical methods, such as zeta potential, are a powerful tool to analyze the electrostatic interactions on the surface of the liposomes and the lipoplexes.<sup>4,34,36–40</sup> Fluorescence anisotropy is used to check the fluidity of the lipidic bilayer of liposomes in the absence and presence of DNA, which is related to the release of DNA into the mammalian cells.<sup>34,39,41–51</sup> In addition and with the object of determining the structure of the lipoplexes, this work also reports experiments of small-angle X-ray scattering (SAXS) run at different lipid composition and charge ratios. Furthermore, the compaction process of DNA by the cationic liposomes has also been theoretically analyzed by using a theory recently developed for the interaction among liposomes and polyelectrolytes.<sup>52,53</sup> Phase diagrams of the resulting lipoplexes, built at the experimentally studied mixed lipid compositions, include the charge inversion and re-entrant condensation processes among the lipoplexes. These phase diagrams contain interesting information to have either anionic or cationic isolated lipoplexes or also clusters of lipoplexes. In particular, it may provide a route to predict the optimal concentrations of DNA and mixed liposome so as to obtain stable complexes in electrolytic solutions from a physicochemical stand point. Nevertheless, this does not mean that such theoretical predictions are sufficient to improve on their own the transfection process, because it leaves out many effects that should be taken into account once the lipoplexes are inside the cell. Accordingly, the combination of the model and the experimental characterization performed in this work provides a first step toward an improved understanding of these complex systems.

## Experimental Details

**Materials.** Cationic lipid,  $\beta\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride (DC-Chol), and zwitterionic lipid 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) were from Avanti Polar Lipids. Cationic lipid belongs to the sterols family and DOPE contains an unsaturation on the *cis* configuration at the 9 position of both hydrocarbon chains (see Scheme 1). Sodium salt of calf thymus

DNA (CT-DNA) was from Sigma-Aldrich. All of them, with the best purities, were used without further purification. Solutions were prepared with distilled and deionized water (Super Q Millipore system, conductivity lower than  $18 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), and all were buffered with PBS buffer at around physiological conditions (pH = 7.5 and ionic strength of 160 mM).

**Preparation of Solutions.** Liposome and lipoplex solutions were prepared according to a protocol widely explained elsewhere.<sup>54</sup> Several lipid compositions (in terms of molar fractions,  $\alpha$ , and lipoplex compositions (in terms of either mass ratio,  $L/D$ , or charge ratio, CR) were prepared. These quantities are defined as follows:

$$\alpha = \frac{n_{L^+}}{n_{L^+} + n_{L^0}} \quad (1)$$

$$\frac{L}{D} = \frac{L^+ + L^0}{D} \quad (2)$$

$$\text{CR} = \frac{n^+}{n^-} = \frac{L^+/M_{L^+}}{2D/\bar{M}_{\text{bp}}} \quad (3)$$

where  $n_{L^+}$  and  $n_{L^0}$  stand for the number of moles of cationic and zwitterionic lipids, respectively;  $n^+$  and  $n^-$  are the number of moles of positive and negative charges, coming from cationic lipid and DNA, respectively;  $L^+$  and  $L^0$  are the masses of cationic and zwitterionic lipids (thus,  $L = L^+ + L^0$ , is the total mass of lipid);  $M_{L^+}$  is the molar mass of cationic lipid and  $\bar{M}_{\text{bp}}$  is the average molar mass per DNA base pair. A stock solution of CT-DNA was prepared two days before the mixing with liposomes. DNA concentrations (expressed in mM base pairs) were determined by absorbance at 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).<sup>55,56</sup> A  $A_{260}/A_{280}$  ratio of 1.90 and a negligible absorbance at 320 nm ( $A_{320} = -0.003$ ) reveal<sup>35,55–57</sup> that the contamination of the DNA used in this work by the presence of a certain percentage of proteins is negligible.

**Experimental Methods.** The phase Analysis Light Scattering technique (*Zeta PALS*, Brookhaven Instrum. Corp., U.S.A.) was used to measure electrophoretic mobilities (and from it, zeta potential) and particle sizes. This interferometric technique is up to 1000 times more sensitive than traditional light scattering methods based on the shifted frequency spectrum and uses phase analysis light scattering to determine the electrophoretic mobility of charged colloidal suspensions. Temperature was controlled at  $(298.15 \pm 0.01 \text{ K})$ . Each electrophoretic mobility data is taken as an average of over 50 independent measurements. Electrophoretic mobility for liposome and lipoplex solutions was measured at each  $\alpha$  as a function of  $L/D$  ratio.

Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were carried out on a Bruker AXS nanostar small-angle X-ray scattering instrument. The instrument uses Cu KR radiation ( $1.54 \text{ \AA}$ ) produced in a sealed tube. Samples were placed in sealed glass capillaries purchased from Hilgenberg with an outside diameter of 1.5 mm and wall thickness of 0.01 mm. The sample chamber is under vacuum. The scattered X-ray are detected on a two-dimensional multiwire area detector (Bruker Hi-Star) and can be converted to one-dimensional scattering by radial averaging and represented as a function of momentum transfer vector  $q (= 4\pi \sin \theta/\lambda)$  in which  $\theta$  is half the scattering angle and  $\lambda$  is the wavelength of the incident X-ray beam. The sample to detector distance was 0.63 m. Measurements on each sample were collected over four cycles of 30 min each to ensure the stability of the lipoplexes. SAXS experiments were run at three different CR ratios in the whole range of composition.

Fluorescence anisotropy of diphenylhexatriene (DPH) probe was measured with a Perkin-Elmer LS-50B Luminiscence Spectrometer by following an experimental protocol widely explained elsewhere.<sup>58</sup> Anisotropy values  $r (= (I_{VV} - GI_{VH})/(I_{VV} + 2GI_{VH}))$  were determined by measuring the intensities of the light emitted by DPH probe, with

the excitation and the emission polarized following the modes vertical–vertical,  $I_{VV}$ , vertical–horizontal,  $I_{VH}$ , horizontal–horizontal,  $I_{HH}$ , and horizontal–vertical,  $I_{HV}$ . The instrument grating factor,  $G$  ( $= I_{HV}/I_{HH}$ ), estimated as an average of 10 measurements for each solution, allows to correct optical and electronic differences in the parallel and perpendicular channels. The influence of the light scattering of samples in anisotropy values was also evaluated and considered with the corresponding blank solutions. Each anisotropy value is an average over 36 experimental independent measurements.

**Theoretical Background.** As in a previous work,<sup>59</sup> the formalism derived by Sennato et al.<sup>52</sup> has been used to analyze theoretically the complexation of liposomes and DNA. This formalism is in turn based on the theory developed by Nguyen and Shklovskii<sup>60,61</sup> to describe the complexation of a long flexible charged polyelectrolyte with oppositely charged spherical and rod-like particles. According to the model, a phase diagram can be obtained to characterize the whole complexation process in which lipoplexes experience aggregation (condensation) and disaggregation (reentrant condensation) as a function of the liposome–DNA ratio. Namely, for a given concentration of DNA and growing concentration of liposomes, lipoplexes experience aggregation at some critical concentration,  $S_a$ , below isoneutrality, and remain in this aggregated (or condensed) state up to another concentration,  $S_d$ , above isoneutrality. For concentrations of liposomes higher than  $S_d$ , clusters of lipoplexes start to disaggregate as a consequence of a charge inversion process.<sup>52,59</sup> Although the molecular origin of this last counterintuitive process is not explained in detail by the model, it is qualitatively justified in terms of the correlation-induced attraction of a new liposome to a neutral complex at the isoelectric point. For these liposome concentrations, a new liposome could push away liposomes from the complex, unwind some of the DNA from them, and wind it on itself.<sup>52,59</sup> Anyhow, according to Sennato et al., a more realistic model is required to include factors such as the rigidity of the DNA that undoubtedly would play a relevant role in the reentrant aggregation.<sup>52,59</sup>

In summary, this phenomenological theory predicts that for a given concentration of DNA,  $P$ , the system can be described in terms of the DNA concentration in the limit of negligible liposome concentrations,  $P_0$ , that is, DNA concentration in equilibrium with lipoplexes. The resulting phase diagram is given by two equations that can be solved in terms of  $P_0$  and  $E_0$  parameters, last one related to the energy gained per complex normalized by the number of DNA polyions,  $N_i$ , necessary to neutralize the liposome charge ( $N_i = Q/w$ ).

$$S_a \frac{Q}{w} \left( 1 + \sqrt{\frac{2C|E_0|}{wQ}} \right) = P - P_0 \exp \left( \sqrt{\frac{2wQ|E_0|}{C(k_B T)^2}} \right) \quad (4)$$

$$S_d \frac{Q}{w} \left( 1 - \sqrt{\frac{2C|E_0|}{wQ}} \right) = P - P_0 \exp \left( -\sqrt{\frac{2wQ|E_0|}{C(k_B T)^2}} \right) \quad (5)$$

where  $-w$  and  $l$  are the total charge and contour length of DNA, respectively;  $Q$  is the positive charge of liposomes and  $C = 4\pi\epsilon_0\epsilon R$  is the electrical capacitance,  $\epsilon_0$  and  $\epsilon$  being the vacuum and relative permittivity, respectively, and  $R$  the liposome radius). This set of equations allows us to calculate the two boundaries concentration of liposomes  $S_a$  and  $S_d$ . The concentration of liposomes where the aggregates are neutrally charged (isoneutrality) can be obtained as well from the model. This liposome concentration, denoted as  $S_\phi$ , is given by<sup>52,61</sup>

$$S_\phi = \frac{P - P_0}{N_i} \quad (6)$$

This concentration can be also expressed in terms of theoretical isoneutrality mass ratio,  $(L/D)_{\phi, \text{theo}}$ , by means of

$$(L/D)_{\phi, \text{theo}} = \frac{S_\phi(P)\Phi}{P\bar{\Lambda}} \left( \frac{\alpha M_{L^+} + (1 - \alpha)M_{L^0}}{M_{bp}} \right) \quad (7)$$

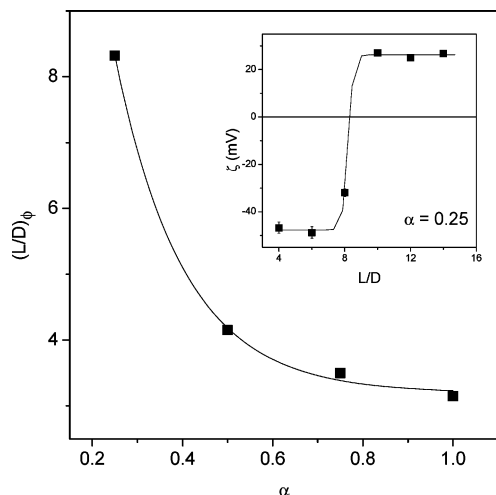
where  $\bar{\Lambda}$  is the average number of base pairs per DNA segment and  $\Phi$  is the number of lipids per liposome.

## Results and Discussion

It is known that many properties of lipoplexes change at the so-called isoneutrality point, that, in terms of lipoplex composition, is defined as the  $L/D$  ratio,  $(L/D)_\phi$ , at which the negative charges of DNA are neutralized by the positive charges of the liposomes, or, in other words, the composition at which the charge ratio of the lipoplexes, CR, equals 1 in eq 3. Furthermore, this parameter defines the lower limit of the lipoplex composition range from which the net charge of the complex is positive, a necessary requirement for transfecting the cells. Several experimental methods have been used to determine this ratio, but the most direct way of doing so is to work with electrochemical properties, such as, electrophoretic mobility,  $\mu_e$ , zeta potential,  $\zeta$ , or the surface charge density enclosed by the shear plane,  $\sigma_\zeta$ , because all of them show an inversion of sign at this particular  $L/D$  value. In this work,  $\zeta$  values have been obtained from electrophoretic mobility, using Henry equation with Smoluchowski limit.<sup>62</sup> Characteristic sigmoidal curves are usually obtained when representing  $\mu_e$ , or  $\zeta$  as a function of either  $L/D$  ratio or CR (see the inset of Figure 1, as an example, for the system studied in this work at  $\alpha = 0.25$ ). In these graphs one can observe how lipoplexes show net negative or positive  $\mu_e$  or  $\zeta$  values below or above, respectively, a particular  $L/D$  ratio assigned to the isoneutrality,  $(L/D)_\phi$ . This inversion of sign reveals that the electrostatic interaction among liposomes and DNA takes place at the surface of the colloidal aggregates, the release of chloride and sodium counterions from cationic lipid and DNA phosphates, respectively, being the driving force. From these electrophoretic data, we obtain directly the experimental values of  $S_a$ ,  $S_\phi$ , and  $S_d$ , being those liposome concentrations at which the mobility starts to decrease, reaches the isoneutrality and achieve a maximum, respectively. As it will be shown later, these values will be used as input parameters to build the corresponding theoretical phase diagrams. Figure 1 shows the effect that mixed liposome composition,  $\alpha$ , has on this isoneutrality ratio. As expected, as long as the content of cationic lipid increases on liposome composition, the isoneutrality is reached at lower  $L/D$  ratios, for a given DNA concentration. PALS technique also allows for the determination of the sizes of mixed liposomes; an average hydrodynamic diameter of  $(120 \pm 10)$  nm has been obtained in agreement with cryo-TEM results, previously reported by us for this lipoplex at  $\alpha = 0.5$ .<sup>28</sup> No other effect of lipid composition was observed due to the fact that DC-Chol and DOPE lipids, although with different shape, have a hydrophobic region with a similar length (see Scheme 1).

This inversion of sign process has been also analyzed, from a theoretical point of view, by means of the aggregation–disaggregation theoretical model (or condensation/re-entrant condensation), briefly presented in a previous section. This model has been applied to predict the phase diagrams of the lipoplexes studied in this work, consisting of plots of DNA concentration,  $P$ , versus liposome concentration,  $S$ , with the characteristic boundary lines for aggregation,  $S_a(P)$ , and disaggregation,  $S_d(P)$ , as well as the electroneutrality lines,  $S_\phi(P)$ , at which the lipoplex charge inverts the sign. Table 1 displays the input data required to calculate the free parameters  $P_0$  and  $E_0$  of the theory by





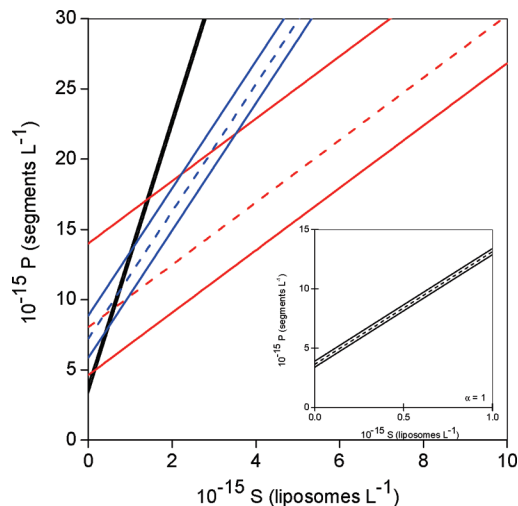
**Figure 1.** Electrochemical study: the main figure shows the values of isoneutrality  $L/D$  ratios,  $(L/D)_\phi$ , as a function of mixed liposome composition in terms of molar fractions,  $\alpha$ . Inset: Plot of zeta potential,  $\zeta$ , as a function of lipoplex composition  $L/D$ , for lipoplexes with  $\alpha = 0.25$  in aqueous buffered medium at 298.15 K. Solid line: sigmoidal fit of experimental values. Errors are estimated to be around 3%. DNA concentration was kept constant at 0.05 mg/mL and the total lipid concentration was varied, depending on the lipid composition, to cover a wide  $L/D$  ratio range (in the inset from 4 to 14).

**Table 1.** Input Parameters on the Aggregation–Disaggregation Theory and Results Obtained for DC-Chol/DOPE-DNA Lipoplexes at Three Different Liposome Compositions,  $\alpha$

| parameter <sup>a</sup>                    | $\alpha = 0.25$ | $\alpha = 0.5$ | $\alpha = 1$ |
|---|-----------------|----------------|--------------|
| $R/\text{nm}$                             | 49.5            | 49.5           | 49.5         |
| $10^{16} C/(\text{C}^2 \text{J}^{-1})$    | 4.323           | 4.323          | 4.323        |
| $\Phi/(\text{lipids/liposome})$           | 87000           | 88400          | 92800        |
| $Q/(C/e)$                                 | 12000           | 24450          | 51300        |
| $w/(C/e)$                                 | 5400            | 5400           | 5400         |
| $10^{-15} P/(\text{DNA segments/L})$      | 17.16           | 17.16          | 17.16        |
| $10^{-15} S_a(P)/(\text{liposomes/L})$    | 3.90            | 1.83           | 1.33         |
| $10^{-15} S_d(P)/(\text{liposomes/L})$    | 4.30            | 2.49           | 2.11         |
| $10^{29} E_0/(\text{J})$                  | 0.67            | 4.57           | 24.81        |
| $10^8 E_0/kT$                             | 0.16            | 1.11           | 6.03         |
| $10^{-15} P_0/(\text{DNA segments/L})$    | 8.04            | 7.21           | 3.64         |
| $10^{-15} S_\phi(P)/(\text{liposomes/L})$ | 4.11            | 2.20           | 1.42         |

<sup>a</sup>  $R$ , liposome radius (errors of  $\pm 0.5$  nm);  $C$ , liposome capacitance;  $\Phi$ , number of lipids per liposome;  $Q$ , liposome charge;  $w$ , charge of DNA segment;  $P$ , DNA concentration;  $S_a(P)$ , liposome concentration at aggregation;  $S_d(P)$ , liposome concentration at disaggregation;  $E_0$ , DNA–liposome interaction energy;  $P_0$ , DNA concentration in equilibrium with lipoplexes; and  $S_\phi(P)$ , liposome concentration at isoneutrality.

solving eqs 4 and 5, as well as the obtained results. In particular,  $P$  is the DNA concentration used in the electrophoretic experiments,  $w$  is based on the 2700 bp fragments on average obtained from agarose gel electrophoresis experiments,  $Q$  is calculated from the surface area of the liposome and the estimated area for the headgroup of the lipid,  $E_0$  and  $P_0$  are phenomenological parameters related to the strength of liposome–DNA binding and DNA concentration in equilibrium with the lipoplexes, respectively, and the values of  $S_a(P)$  and  $S_d(P)$  are obtained from electrophoresis experiments. Several remarks can be extracted from results in Table 1: (i) it can be noticed that  $P_0 \ll P$  in all cases, which agrees with the assumption consisting in that most of the DNA molecules are forming complexes; (ii) accordingly, the total energy required for DNA complexation (normalized by the thermal energy,  $k_B T$ ) is much lower than 1, in agreement with the spontaneous condensation of DNA by liposomes observed in the experiments; (iii) it is also remarkable that a higher  $E_0$  is predicted by the theory when the proportion of zwitterionic lipid increases, which agrees with the fact that the

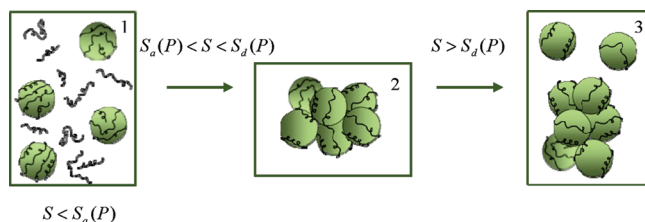


**Figure 2.** Phase diagram for DC-Chol/DOPE-DNA lipoplexes with a liposome composition of  $\alpha = 0.25$  (red),  $0.5$  (blue), and  $1$  (black), according to the aggregation–disaggregation theory. Solid lines are  $S_a(P)$  and  $S_d(P)$ , while dashed line is  $S_\phi(P)$ . Inset: Zoom view of the phase diagram at  $\alpha = 1$ .

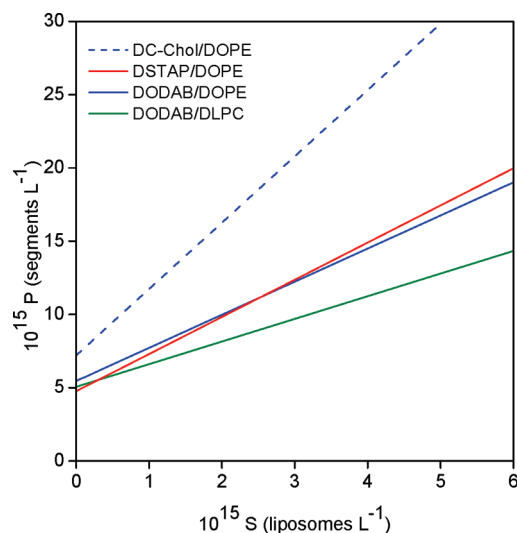
interaction energy between the DNA and cationic lipids is more intense than that between the polyanion and the zwitterionic lipids. Even so, the theory predicts very small  $E_0$  values for the three compositions, which could be indicating that a change on liposome composition does not affect appreciably the interaction energy between DNA and liposomes. Finally, these values for  $E_0$  and  $P_0$  are of the same order of magnitude as those reported for similarly charged lipoplexes made of DODAB/DOPE-DNA and DODAB/DLPC-DNA.<sup>59</sup>

Figure 2 shows the theoretical phase diagram for DC-Chol/DOPE-DNA lipoplexes at the three liposome compositions. Given a constant value for  $E_0$  and  $P_0$ , the phase diagram predicts the existence of negatively charged stable lipoplexes at  $S < S_d(P)$  in excess of free anionic polyelectrolyte. If  $S$  increases, lipoplexes may experience aggregation and clusters of lipoplexes are formed. Previously reported cryo-TEM micrographs<sup>28,54,59</sup> for other lipoplexes and for that one studied in this work with  $\alpha = 0.5$ , confirm the formation of these cluster structures. In this domain of  $S$  concentration, that is, for  $S_d(P) < S(P) < S_a(P)$ , the isoneutrality of the lipoplexes,  $S_\phi(P)$ , is reached and, accordingly, the electrophoretic mobility and, thus, zeta potential is null. However, the theory predicts at this point that complexes attract more cationic liposomes than those required to neutralize the negative charge,<sup>60,61</sup> thus provoking a charge inversion for  $S > S_\phi(P)$ . Finally, for  $S > S_d(P)$ , clusters start to partially dissolve, giving rise to stable and free positively charged lipoplexes, in coexistence with the remaining clusters. Scheme 2 shows an illustration of the above-mentioned transitions. It can also be observed in Figure 2 that for a given DNA concentration (draw an imaginary horizontal line) the boundary lines are shifted toward lower liposome concentrations in the order  $(\alpha = 1) > (\alpha = 0.5) > (\alpha = 0.25)$ , as expected. This feature is in agreement with the fact that the bare charge of liposomes with  $\alpha = 0.25$  is smaller than those ones for  $\alpha = 0.5$  and  $\alpha = 1$ . Accordingly, those lipoplexes consisting of liposomes with the cationic lipid as the major component require a lower number of liposomes to induce charge inversion. As a consequence, alterations in the charge of the liposome determine the manner in which the different phase transitions occur. Furthermore, this also involves that the  $S_a(P) - S_d(P)$  concentration range gets wider as long as liposome composition,  $\alpha$ , decreases. In fact, the three boundary lines ( $S_a$ ,  $S_\phi$ , and  $S_d$ ) seem



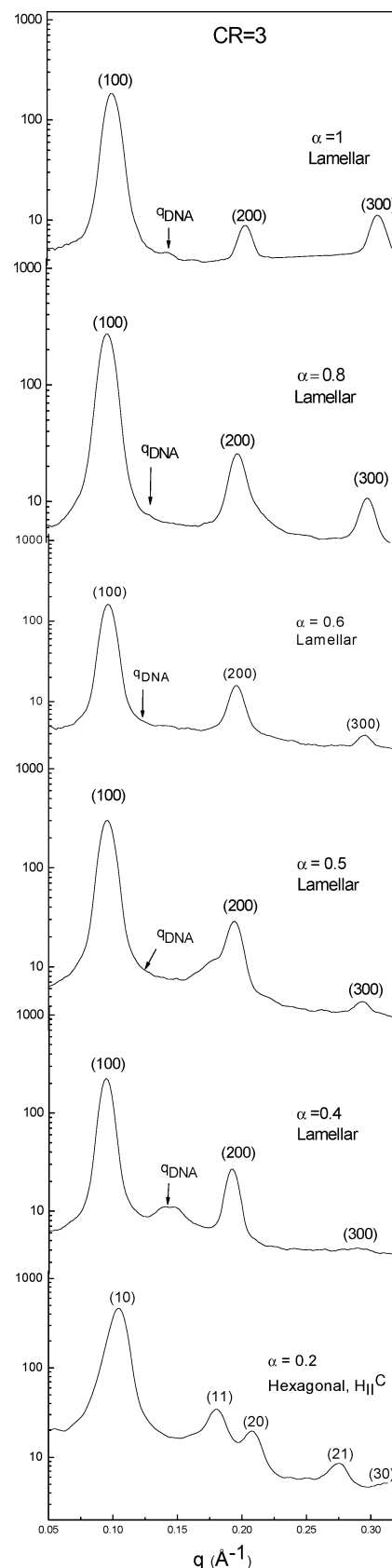
**Scheme 2.** Illustrative Diagram of the Transitions Predicted by the Theoretical Aggregation–Disaggregation Model<sup>a</sup>

<sup>a</sup> (1) Isolated lipoplexes with net negative charge, in coexistence with the anionic polyelectrolyte DNA; (2) clusters of lipoplexes with net charge around or equal to zero (isoneutrality); and (3) clusters of lipoplexes in coexistence with isolated lipoplexes with net positive charge.

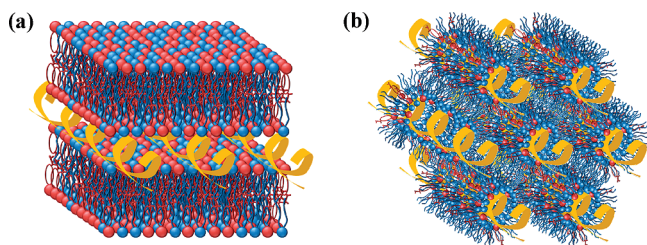
**Figure 3.** Isonutrality boundary lines,  $S_\phi(P)$ , for DC-Chol/DOPE-DNA (this work, blue dashed line), DODAB/DOPE-DNA (solid blue line), DSTAP/DOPE-DNA (red solid line), and DODAB/DLPC-DNA (green solid line) lipoplexes with equimolar lipid compositions,  $\alpha = 0.5$ .<sup>54</sup>

to coincide for the system with  $\alpha = 1$  in the main plot of Figure 2; these lines can be differentiated only in the zoom view of the inset. It means that the liposome concentration range within which lipoplexes aggregate to form clusters and the isoneutrality of the system is reached, gets narrower as long as the content on helper lipid decreases on the mixed liposome, and its positive charge increases. Equation 7 has been used to calculate theoretical isoneutrality mass ratios,  $(L/D)_{\phi, \text{theo}}$ . For that purpose,  $\Phi$  has been calculated assuming a lipidic bilayer with a thickness of 4.0 nm, liposome surface areas of the spherical liposomes calculated by using the diameters found in electrophoretic experiments, and polar headgroups with average surfaces, calculated considering the values of the pure lipids and liposome composition,  $\alpha$ . Values of 8.1 at  $\alpha = 0.25$ , 4.1 at  $\alpha = 0.5$ , and 2.4 at  $\alpha = 1$  were obtained, in good concordance with the experimental results.

Figure 3 shows the isoneutrality boundary lines for the lipoplex studied in this work, together with those ones for other lipoplexes studied by us previously,<sup>59</sup> with a mixed liposome composition of  $\alpha = 0.5$ , for comparison. It is noticeable that for a given DNA concentration the boundary lines are shifted toward higher liposome concentrations in the order DC-Chol/DOPE-DNA < DODAB/DOPE-DNA < DSTAP/DOPE-DNA < DODAB/DLPC-DNA, indicating that those lipoplexes consisting of DOPE as a helper lipid require a lower number of liposomes to induce charge inversion, feature that may be quite advantageous since they may be less cytotoxic. This feature is in agreement with the fact that the bare charge of DODAB/

**Figure 4.** Diffractograms of DC-Chol/DOPE-DNA lipoplexes at different mixed lipid composition,  $\alpha$ , and a charge ratio  $CR = 3$ . DNA concentration was varied from 0.6 to 2.0 mg/mL and the total lipid concentration was varied from 5 to 32.

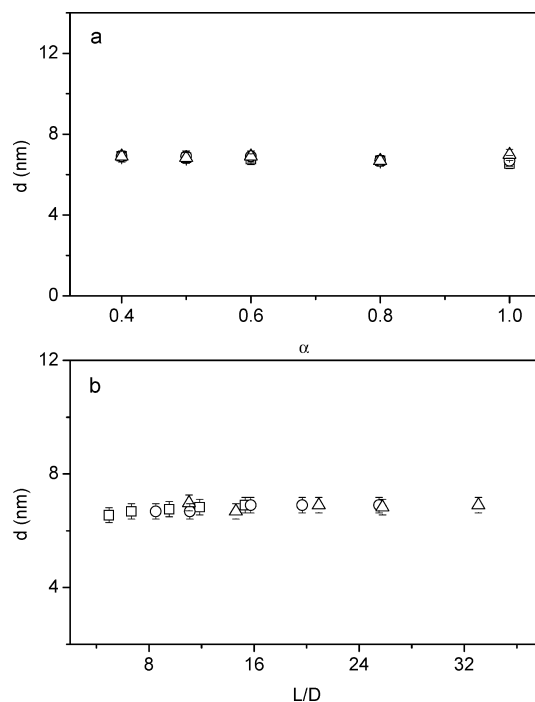
DLPC is smaller than those estimated for DC-Chol/DOPE, DODAB/DOPE, and DSTAP/DOPE (see Table 1 on this work

**Scheme 3.** (a) Lamellar Structure,  $L_\alpha$ , and (b) Inverted Hexagonal Structure,  $H_{II}$ 

and Table 3 in ref 59) This work corroborates that DOPE is a very appropriate helper lipid, not only from the biochemical experiments on transfecting cells (the efficiency of DOPE as a fusogenic lipid and as a gene transfer agent is widely documented on the literature related with gene therapy),<sup>8,22,33–35,63,64</sup> but also from a physicochemical point of view. In addition, regarding the cationic lipid, it seems that DC-Chol, the cholesterol derivative used in this work, may play a better role on lipofection than its counterparts of dialkylamines (DODAB) or diols (DSTAP) families.

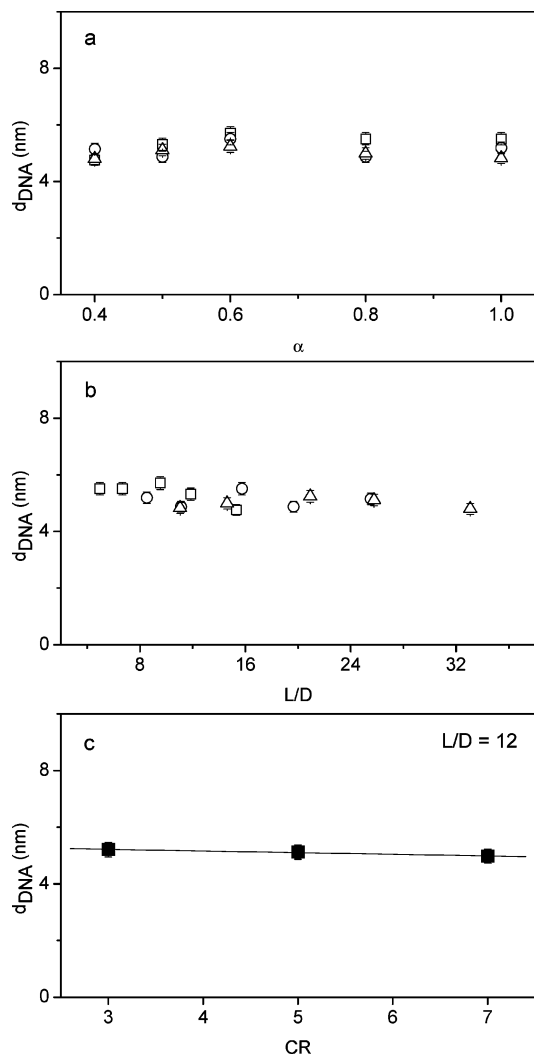
SAXS experiments were carried on covering the whole composition range of the lipid composition,  $\alpha$ , at three charge ratios, CR (= 3, 5, and 7), which means that all the lipoplexes are positively charged. Figure 4 shows, as an example, a set of SAXS diffractograms of the lipoplexes, where intensity is plotted versus  $q$  factor at CR = 3, for six lipid compositions. Bragg peaks on these diffractograms show that, for  $\alpha \geq 0.4$ , lipoplexes form a lamellar structure,  $L_\alpha$ , with the interlayer distance,  $d$ , directly related to the  $q$  factor ( $d = 2\pi/q_{100}$ ). Based on that and according to Scheme 3a, lipoplexes can be represented as alternating layers of mixed lipids and DNA helices where  $d$  is the sum of the thicknesses of the lipid bilayer,  $d_m$ , and the DNA aqueous layer,  $d_w$ . Accordingly, the Bragg peak on the diffractograms not corresponding to the lamellar structure arise from the DNA–DNA correlation, and its  $q_{DNA}$  factor permits to obtain the separation between DNA strands in the monolayer,  $d_{DNA}$  ( $= 2\pi/q_{DNA}$ ; see Scheme 3a). In those cases where peaks are difficult to see, a protocol consisting of applying a second derivative to the diffractogram in the region where the peak is expected is applied. SAXS results are in good agreement with previously reported cryo-TEM micrographs that confirm the presence of free lipoplexes as well as clusters of lipoplexes with multilamellar structure for DC-Chol/DOPE-DNA lipoplexes with  $\alpha = 0.5$  around and above the isoneutrality.<sup>28</sup> Similar conclusions were also extracted for other lipoplexes.<sup>54,59</sup>

Plots of the periodic distance of the lamellar structure,  $d$ , versus  $\alpha$  and  $L/D$ , at the three charge ratios, CR, reported in Figure 5, indicate that  $d$  remains roughly constant within an average value of  $(6.8 \pm 0.2)$  nm. The independency of  $d$  versus  $L/D$  at constant CR has also been found for other lipoplexes.<sup>65</sup> This feature is due to the fact that DC-Chol and DOPE lipids have a hydrophobic region with a similar length, which implies that the thickness of the mixed lipid bilayer,  $d_m$ , should not change with the lipid composition. If a value of  $d_m \approx 4.0$  nm is assumed, the thickness of the DNA monolayer,  $d_w$  ( $= d - d_m$ ) can be obtained. The calculated value  $d_w = (2.8 \pm 0.2)$  nm, obviously independent of  $\alpha$ ,  $L/D$ , and CR, is very consistent with the presence of a monolayer of the hydrated DNA helices. The results for  $d$  and  $d_m$  for the lamellar structure are consistent with those ones previously obtained by us with cryo-TEM for either this system at  $\alpha = 0.5$ <sup>28</sup> or other cationic/zwitterionic lipid–DNA lipoplexes.<sup>59</sup> Furthermore, Figure 6 shows how the separation between the DNA helices,  $d_{DNA}$ , in the aqueous

**Figure 5.** Plots of the periodic distance of the lamellar structure,  $d$ , as a function of (a)  $\alpha$  and (b)  $L/D$ , at charge ratios, CR, of 3 (squares), 5 (circles), and 7 (triangles).

monolayer of the lamellar structure remains approximately constant with  $\alpha$  and  $L/D$  at the three charge ratios within an average value of  $(5.2 \pm 0.2)$  nm. Two different behaviors of  $d_{DNA}$  versus  $L/D$  (at constant CR) have been found in the literature for lipoplexes formed by DNA and DOTAP/DOPE mixed lipids:<sup>65</sup> (i) one for lipoplexes with  $L/D < 5$ , where  $d_{DNA}$  increases with  $L/D$  and (ii) another one for lipoplexes with  $L/D > 5$ , where  $d_{DNA}$  remains constant with  $L/D$ . This second behavior is in agreement with that one found in Figure 6, due to the fact that  $d_{DNA}$  values reported herein have been obtained at  $L/D$  ranging from 5 to 34. However, Figure 6 also shows that  $d_{DNA}$  remains constant as well with CR, something that initially was unexpected. In fact, by simple geometrical considerations one should expect that at constant CR,  $d_{DNA}$  should decrease with  $\alpha$ , as it was reported in the literature for DOTAP/DOPE-DNA lipoplexes in water solution.<sup>66</sup> Nevertheless, the same work,<sup>66</sup> from the study reported at high salt concentration (similar to the cell culture solutions and also very similar to that one supplied by the buffer solution used in the present work), concludes that  $d_{DNA}$  values at high CR (as we studied here) remains roughly constant with the mixed liposome composition,  $\alpha$ . Thus, these authors<sup>66</sup> conclude that both the high ionic strength of the media and the fact that free liposomes and lipoplexes are expected to coexist at high lipid concentrations may be the factors under this trend. This behavior, clearly found as well in Figure 6c, where  $d_{DNA}$  is plotted as a function of CR for a given  $L/D$  ratio, is very important for transfection of lipoplexes because the high ionic strength of physiological media in cell and tissues affect the efficiency as transfection agents.<sup>66</sup>

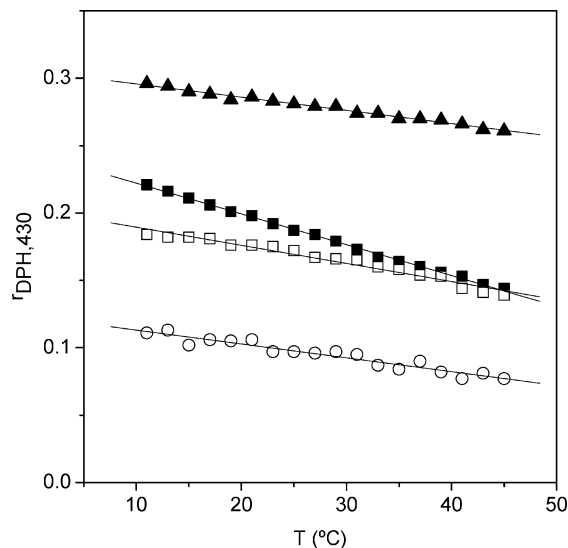
On the other hand, the Bragg peaks observed on SAXS diffractogram at  $\alpha = 0.2$  of Figure 4 index very well on a 2D hexagonal lattice,  $H_{II}$ , similar to that one shown in Scheme 3b. The spacing,  $a$ , of the cell unit can also be directly related to the  $q$  factor ( $a = d_{DNA} = 4\pi/(3^{1/2}q_{10})$ ). In this hexagonal lattice, a monolayer of mixed lipids with the zwitterionic DOPE as the major component, surrounds the DNA helices, the structure of the DNA-mixed lipids resembling inverted cylindrical micelles.



**Figure 6.** Plots of the distance between DNA helices on the lamellar structure,  $d_{DNA}$ , as a function of (a)  $\alpha$  and (b)  $L/D$ , at charge ratios, CR, of 3 (squares), 5 (circles), and 7 (triangles). (c) Plot of  $d_{DNA}$  as a function of charge ratio, CR, for  $L/D = 12$ .

An almost constant value of  $(6.7 \pm 0.2)$  nm has been obtained on average for  $a = d_{DNA}$  at CR = 3, 5, and 7. These values indicate that, in the hexagonal structure with low cationic lipid content, DNA helices are more separated than in the lamellar one. In any case, and taking into account the lipid chain lengths, the diameter inside the inverted micelle cylinder (equivalent to  $d_w$  in the lamellar structure) is  $(2.7 \pm 0.2)$  nm, which is also consistent with the presence of the hydrated DNA helices.

The effect of the lipoplex structure has been proved to be important in the early stage of the transfection.<sup>5,67,68</sup> Nowadays, it is assumed that the main entry trail to the cells is the endocytosis, being the cationic lipoplex captured by an anionic endosomal vesicle formed from the cellular membrane.<sup>11</sup> It has also been confirmed<sup>5,67</sup> that the interaction between positive charged lipoplexes and anionic membranes is strongly dependent on the lipoplex structure, lamellar or hexagonal, even when both structures contain a zwitterionic lipid, as DOPE. In fact, lipoplexes with lamellar structure captured by endosomal vesicles remain stable, with no fusion occurring between the lipoplex and the vesicle being the DNA release relatively low. On the contrary, lipoplexes with hexagonal structure rapidly fused with the anionic endosomal vesicle, which provokes a loosening of the lipoplex condensed structure. Accordingly, the inverted lipoplex hexagonal structure inside endosome favors,



**Figure 7.** Fluorescence anisotropy at 430 nm ( $r_{DPH,430}$ ) of DPH as a function of temperature for (i) DC-Chol/DOPE liposomes with  $\alpha = 1$  (solid triangles) and  $\alpha = 0.5$  (solid squares) and (ii) DC-Chol/DOPE/DNA lipoplexes at  $L/D = 7$ , with  $\alpha = 0.5$  (open squares) and  $\alpha = 0.3$  (open circles). Errors by light scattering are less than 3%. DPH (included in liposome membranes by following a procedure widely explained elsewhere<sup>58</sup>) was excited at 360 nm and its fluorescence emission was recorded at 430 nm, with slit widths of 2.5 nm for both the excitation and the emission.

after fusion, that DNA is easier released and expelled to the cytoplasm.<sup>67</sup> For that reason, research groups involved in this subject are looking for hexagonal or cubic lipoplex structures with proven better efficiency in transfection than lamellar ones.<sup>68,69</sup> In this respect, it can be concluded that the lipoplex studied in this work, DC-Chol/DOPE-DNA, is potentially an adequate gene transvector if the liposome composition presents a deficit on the cationic component, because an inverted hexagonal phase has been found in such cases.

It is known that fluorescence anisotropy,  $r$ , serves as a measurement of membrane fluidity, since, as long as membrane becomes more fluid, the degree of rotation of an excited fluorophore placed within will increase, and, accordingly, anisotropy decreases. Figure 7 shows anisotropy values of the non polar DPH fluorophore buried within the hydrophobic part of the lipidic bilayer of DC-Chol/DOPE liposomes, in the absence and in the presence of DNA, as a function of temperature. It can be noticed that the fluidity of the liposome bilayer increases (anisotropy monotonously decreases) with increasing temperature in both cases. In fact, it has been previously reported<sup>59</sup> that the presence of DOPE as helper lipid induces a rather monotonous decrease on anisotropy. Given that no change on the slope of  $r$  versus  $T$  profiles in Figure 7 is observed, it can be concluded that gel-to-fluid transition temperatures,  $T_m$ , of pure DC-Chol and mixed DC-Chol/DOPE liposomes are below the experimental temperature range studied, which confirms that liposome and lipoplexes bilayers are in the fluid state at physiological temperature, and, accordingly, at the temperature of both the electrochemical and SAXS experiments carried on in this work. Other interesting conclusions can be also extracted from Figure 7: (i) The presence of DOPE as helper lipid favors the fluidity of the liposome (decreases  $r$  at any  $T$ ), as previously found for other lipoplexes.<sup>34,39,41,42,44,45,48,50,51,59</sup>

It is well-known that the inclusion of DOPE, increases liposome stability, due in part to its low  $T_m$ , reducing  $T_m$  of the mixture below room temperature, and also to its structure, a typical cone-shaped molecule (with a packing parameter above 1) with a

known tendency to form inverted hexagonal phases.<sup>65,67</sup> (ii) For a fixed liposome composition,  $\alpha$ , the interaction with DNA does not modify the anisotropy versus  $T$  profiles and does not seem to affect very much the fluidity of the bilayer because anisotropy values for DC-Chol/DOPE-DNA lipoplexes are similar to those for the mixed liposome, with this feature being more evident as the temperature increases. Similar results have been reported for other lipoplexes,<sup>59</sup> while a decrease on lateral diffusion of the lipids by DNA complexation has been found in surfoplexes (through anisotropy studies)<sup>58</sup> and lipoplexes (by NMR experiments).<sup>70</sup> (iii) However, the decrease of cationic lipid composition,  $\alpha$ , provokes a clear decrease of around 30% on anisotropy values for the resulting lipoplexes. Lipofection efficiency is known to be quite influenced by bilayer fluidity of lipoplexes. At this respect, anisotropy measurements represent a very helpful tool to predict the potential efficacy of transfection process. Anisotropy levels of less than 0.2–0.3 are believed to be related with enough fluid structures to allow for a potentially efficient transfection process.<sup>50</sup> It means that a low content of cationic lipid on the mixed liposomes, with the zwitterionic lipid being the major component, makes the resulting lipoplex more fluid, and, consequently, potentially more efficient on transfecting DNA to the cell. This last conclusion is consistent with that one extracted from SAXS results, that show the presence of hexagonal phases at low  $\alpha$  values, and points again to the low contents on cationic lipid as a potentially favoring factor on transfection.

### Conclusions

A series of experimental techniques (electrophoretic mobility, SAXS, and fluorescence anisotropy), together with a theoretical aggregation–disaggregation model, has evidenced that DC-Chol/DOPE cationic liposomes, with an average hydrodynamic diameter of  $(120 \pm 10)$  nm, properly condense and compact CT-DNA, the liposome and lipoplex compositions being key factors on the properties and structure of the resulting lipoplex. The electrochemical experiments revealed that lipoplex formation process is characterized by a strong entropically driven surface electrostatic interaction. The isoneutrality of the lipoplex thus formed, determined by zeta potential and calculated with the model, decreases with the content of cationic lipid on the mixed liposome. Phase diagrams, theoretically calculated, show a clear effect of the liposome composition: as long as the molar fraction of cationic lipid decreases, the boundary concentration lines ( $S_a(P)$  for aggregation of lipoplexes,  $S_\phi(P)$  for isoneutrality, and  $S_d(P)$  for disaggregation of clusters, are separated from each other (liposome concentration range gets wider) and their slopes decrease. It means that those lipoplexes consisting of liposomes with the cationic lipid as the major component require a lower number of liposomes to induce charge inversion. Furthermore, theoretical predictions point again to DOPE as a very adequate helper lipid and to DC-Chol as a promising cationic lipid, with improved characteristics compared to those of the dialkylamines and diols families. SAXS patterns have revealed that, irrespectively of the lipoplex charge ratio, DC-Chol/DOPE-DNA lipoplexes show an inverted micellar hexagonal structure,  $H_{II}$ , usually related with improved cell transfection efficiency, when the cationic lipid composition on the mixed liposomes,  $\alpha$ , is 0.2, while for higher contents the lipoplexes show a lamellar structure,  $L_\alpha$ . The latest structure is characterized by (i) a periodic distance,  $d$ , that remains roughly constant at  $6.8 \pm 0.2$  nm on average, irrespective of liposomes and lipoplex ( $L/D$  and CR) compositions; (ii) the thickness of the DNA monolayer,  $d_w$ , of around  $2.8 \pm 0.2$  nm (with  $d_m \approx 4.0$  nm) is independent

of  $\alpha$ ,  $L/D$ , and CR and very consistent with the presence of a monolayer of hydrated DNA helixes; and (iii) the separation between the DNA helixes in the aqueous monolayer,  $d_{DNA}$ , which remains approximately constant with  $\alpha$  and  $L/D$ , falls within an average value of  $5.2 \pm 0.2$  nm. On the other hand, the  $H_{II}$  structure is characterized by (i) the spacing of the cell unit,  $a$ , that remains almost constant with CR at around  $6.7 \pm 0.2$  nm, indicating that, in the hexagonal structure, DNA helixes are more separated than in the lamellar one and (ii) the diameter inside the inverted micelle cylinder (equivalent to  $d_w$  in the lamellar structure), with a value of  $2.7 \pm 0.2$  nm, is also consistent with the presence of DNA helixes. Fluorescence anisotropy results have revealed that low cationic lipid contents on the mixed liposome tends to favor more fluid bilayers, which in turn is a potential advantage on transfecting cells. Considering the whole information given by both the experiments and the calculus reported in this work, it can be concluded that DC-Chol/DOPE mixed liposomes are potentially adequate DNA vectors on gene therapy, mostly when they consist of a low content on the cationic lipid, although transfection assays would be necessary to unequivocally ensure it.

**Acknowledgment.** The authors thank MICINN of Spain (Projects Nos. CTQ2009-10002BQU and UCMA05-33-010) and to the Comunidad Autónoma of Madrid (Project No. S-SAL-0249-2006). A.N. thanks MICINN of Spain (Project No. MAT2008-03232) and CSIC (Project No. PIE200750-I021). A.M.-M. thanks the Ministerio de Ciencia e Innovación (Project MAT2009-13155-C04-04) and Junta de Andalucía (Projects P07-FQM-02517 and P09-FQM-4698). Authors also thank C. Aicart for carrying on gel agarose electrophoresis experiments at the Biochemistry and Molecular Biology Department of the UCM of Spain.

### References and Notes

- (1) Felgner, J. H.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 7413–7417.
- (2) Felgner, P. L.; Heller, M. J.; Lehn, J. M.; Behr, J.-P.; Szoka, F. C. *Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery*; American Chemical Society: Washington, DC, 1996.
- (3) Mahato, R. I.; Kim, S. W. *Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid-Base Therapeutics*; Taylor and Francis: London, 2002.
- (4) Lasic, D. D. *Liposomes in Gene Delivery*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- (5) Ewert, K.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Lin, A. J.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 133–149.
- (6) Lonz, C.; Vandenbranden, M.; Ruysschaert, J. M. *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 340–347.
- (7) Ma, B. C.; Zhang, S. B.; Jiang, H. M.; Zhao, B. D.; Lv, H. T. *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 184–194.
- (8) Safinya, C. R.; Ewert, K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Raviv, U.; Needleman, D. J.; Lin, A. J.; Slack, N. L.; George, C.; Samuel, C. E. *Philos. Trans. R. Soc., A* **2006**, *364*, 2573–2596.
- (9) Dias, R. S.; Lindman, B. *DNA Interaction with Polymers and Surfactants*; Wiley and Sons: Hoboken, NJ, 2008.
- (10) Ahmad, A.; Evans, H. M.; Ewert, K.; George, C. X.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 739–748.
- (11) Lin, A. J.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; George, C. X.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3307–3316.
- (12) Esposito, C.; Generosi, J.; Mossa, G.; Masotti, A.; Castellano, A. C. *Colloids Surf., B* **2006**, *53*, 187–192.
- (13) Choi, J. S.; Lee, E. J.; Jang, H. S.; Park, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 108–113.
- (14) Farhood, H.; Serbina, N.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 289–295.
- (15) Kreiss, P.; Cameron, B.; Rangara, R.; Mailhe, P.; Aguerre-Charriol, O.; Airiau, M.; Scherman, D.; Crouzet, J.; Pitard, B. *Nucleic Acid Res.* **1999**, *27*, 3792–3798.



- (16) Caplen, N. J.; Alton, E. W.; Middleton, P. G.; Dorin, J. R.; Stevenson, B. J.; Gao, X.; Durham, S. R.; Jeffrey, P. K.; Hodson, M. E. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 39–46.
- (17) Bajaj, A.; Kondiah, P.; Bhattacharya, S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2432–2442.
- (18) Bajaj, A.; Kondiah, P.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1537–1546.
- (19) Ding, W.; Hattori, Y.; Higashiyama, K.; Maitani, Y. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354*, 196–203.
- (20) Ghosh, Y. K.; Visweswariah, S. S.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 378–384.
- (21) Reynier, P.; Briane, D.; Coudert, R.; Fadda, G.; Bouchemal, N.; Bissieres, P.; Taillandier, E.; Cao, A. *J. Drug Targeting* **2004**, *12*, 25–38.
- (22) Zuidam, N. J.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1368*, 115–128.
- (23) Caracciolo, G.; Caminiti, R. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *411*, 327–332.
- (24) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Amenitsch, H.; Caminiti, R. *Langmuir* **2005**, *21*, 11582–11587.
- (25) Ciani, L.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Ristori, S.; Messori, L.; Martini, G. *Biophys. Chem.* **2007**, *127*, 213–220.
- (26) Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L. *FEBS Lett.* **1994**, *356*, 361–366.
- (27) Congiu, A.; Pozzi, D.; Esposito, C.; Castellano, C.; Mossa, G. *Colloids Surf., B* **2004**, *36*, 43–48.
- (28) Rodriguez-Pulido, A.; Ortega, F.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12555–12565.
- (29) Lasic, D. D.; H., S.; Stuart, M. A. C.; R., P.; Frederik, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 832–833.
- (30) Barreleiro, P. C. A.; Olofsson, G.; Brown, W.; Edwards, K.; Bonassi, N. M.; Feitosa, E. *Langmuir* **2002**, *18*, 1024–1029.
- (31) Feitosa, E.; Alves, F. R.; Niemiec, A.; Oliveira, M.; Castanheira, E. M. S.; Baptista, A. L. F. *Langmuir* **2006**, *22*, 3579–3585.
- (32) Salvati, A.; Ciani, L.; Ristori, S.; Martini, G.; Masi, A.; Arcangeli, A. *Biophys. Chem.* **2006**, *121*, 21–29.
- (33) Gustafsson, J.; Arvidson, G.; Karlsson, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 305–312.
- (34) Xu, Y. H.; Hui, S. W.; Frederik, P.; Szoka, F. C. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 341–353.
- (35) Hirsch-Lerner, D.; Zhang, M.; Eliyahu, H.; Ferrari, M. E.; Wheeler, C. J.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1714*, 71–84.
- (36) Janoff, A. S. *Liposomes: Rational Design*; Marcel Dekker: New York, 1999.
- (37) Rosoff, M. *Vesicles*; Marcel Dekker: New York, 1996.
- (38) Rädler, J. O.; Koltover, I.; Jamieson, A.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Langmuir* **1998**, *14*, 4272–4283.
- (39) Birchall, J. C.; Kellaway, I. W.; Mills, S. N. *Int. J. Pharm.* **1999**, *183*, 195–207.
- (40) Lobo, B. C.; Rogers, S. A.; Choosakoonkriang, S.; Smith, J. G.; Koe, G. S.; Middaugh, C. R. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *91*, 454–466.
- (41) Eastman, S. J.; Siegel, C.; Tousignant, J.; Smith, A. E.; Cheng, S. H.; Scheule, R. K. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1325*, 41–62.
- (42) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Acad./Plenum: New York, 1999.
- (43) MacDonald, R. C.; Ashley, G. W.; Shida, M. M.; Rakhmanova, V. A.; Tarahovsky, Y. S.; Pantazatos, D. P.; Kennedy, M. T.; Pozharski, E. V.; Baker, K. A.; Jones, R. D.; Rosenzweig, H. S.; Choi, K. L.; Qiu, R.; McIntosh, T. J. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2612–2629.
- (44) Tarahovsky, Y. S.; Koynova, R.; MacDonald, R. C. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1054–1064.
- (45) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7764–7777.
- (46) Geall, A. J.; Eaton, M. A. W.; Baker, T.; Catterall, C.; Blagbrough, I. S. *FEBS Lett.* **1999**, *459*, 337–342.
- (47) Borenstain, V.; Barenholz, Y. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 117–127.
- (48) Hirsch-Lerner, D.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1370*, 17–30.
- (49) Lentz, B. R.; Moore, B. M.; Barrow, D. A. *Biophys. J.* **1979**, *25*, 489–494.
- (50) Regelin, A. E.; Fankhaenel, S.; Gurtesch, L.; Prinz, C.; von Kiedrowski, G.; Massing, U. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1464*, 151–164.
- (51) Ryhänen, S. J.; Säily, M. J.; Pauku, T.; Borocci, S.; Mancini, G.; Holopainen, J. M.; Kinnunen, P. K. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 578–587.
- (52) Sennato, S.; Bordin, F.; Cametti, C. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 4936–4940.
- (53) Sennato, S.; Bordin, F.; Cametti, C.; Di Biasio, A.; Diociaiuti, A. *Colloids Surf., A* **2005**, *270–271*, 138–147.
- (54) Rodriguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Llorca, O.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2187–2197.
- (55) Barreleiro, P. C. A.; Lindman, B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6208–6213.
- (56) Mel'nikov, S. M.; Lindman, B. *Langmuir* **1999**, *15*, 1923–1928.
- (57) Gonçalves, E.; Debs, R. J.; Heath, T. D. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1554–1563.
- (58) Rodriguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Langmuir* **2009**, *25*, 4402–4411.
- (59) Rodriguez-Pulido, A.; Martin-Molina, A.; Rodriguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648–15661.
- (60) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 5905–5916.
- (61) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 7298–7308.
- (62) Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science*; Oxford Science: Oxford, 1995.
- (63) de Lima, M. C. P.; Simoes, S.; Pires, P.; Faneca, H.; Duzgunes, N. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 277–294.
- (64) Hui, S. W.; Langner, M.; Zhao, Y.-L.; Ross, P.; Hurley, E.; Chan, K. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 590–599.
- (65) Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Science* **1997**, *275*, 810–814.
- (66) Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 915–924.
- (67) Koltover, I.; Salditt, T.; Rädler, J. O.; Safinya, C. R. *Science* **1998**, *281*, 78–81.
- (68) Pozzi, D.; Caracciolo, G.; Caminiti, R.; De Sanctis, S. C.; Amenitsch, H.; Marchini, C.; Montani, M.; Amici, A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 2237–2249.
- (69) Bouxsein, N. F.; McAllister, C. S.; Ewert, K. K.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4785–4792.
- (70) Leal, C.; Sandstrom, D.; Nevsten, P.; Topgaard, D. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 214–228.

BM1008124

## Art. 2. Gene Vectors Based on DOEPC/DOPE Mixed Cationic Liposomes: a Physicochemical Study

M. Muñoz-Úbeda; A. Rodríguez-Pulido; A. Nogales; O. Llorca; M. Quesada-Pérez; A. Martín-Molina; E. Aicart; E. Junquera

*Soft Matter* **2011**, 7, 5991-6004

En esta publicación se han estudiado los lipoplejos que se forman al interaccionar el DNA lineal (ctDNA) con el liposoma mixto constituido por el lípido catiónico *Cloruro de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina* (DOEPC) y el lípido zwitteriónico *1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina* (DOPE). El lípido catiónico del sistema, el DOEPC, se eligió por tener la región hidrofóbica idéntica (dos cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono con una insaturación olefínica en configuración *cis* en la posición 9 de las dos cadenas) y una cabeza polar muy similar al DOPE (si bien el DOEPC es un lípido catiónico y el DOPE zwitteriónico) (Esquema 1 del Art. 2). El estudio se ha realizado cubriendo todo el intervalo de fracciones molares del lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y abarcando una amplia relación de carga,  $CR$ , entre el lípido catiónico y el DNA, en la región donde el liposoma mixto es potencialmente adecuado como vector génico, es decir,  $CR > 1$ .

Para realizar este estudio se han utilizado las siguientes técnicas biofísicas experimentales: (a) la movilidad electroforética o potencial zeta,  $\zeta$ , con la que se ha determinado el valor de  $L/D$  en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , a la vez que se ha analizado, desde un punto de vista electroquímico, el tipo de interacción que se produce entre el liposoma mixto y el ctDNA, (b) la dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), que ha aportado información sobre el tipo de estructura que forma el lipoplejo, así como sus características geométricas, (c) la crio-microscopía electrónica de transmisión (crio-TEM) que ha informado del tamaño, forma y morfología de los lipoplejos, y (d) la espectroscopia de fluorescencia (ensayos de intercalación de EtBr) que también permite obtener  $(L/D)_\phi$  y analizar la interacción liposoma mixto-DNA a partir de la disminución de la emisión fluorescente de la sonda cuando es desplazada desde el interior de la doble hebra de DNA al medio, a medida que se forma el lipoplejo.

Por otro lado, se ha llevado a cabo un análisis mediante el modelo teórico aplicado en el Art. 1, pero que incluye una mejora en el cálculo de las cargas del lípido catiónico basada en la renormalización de sus cargas. Este estudio teórico ha permitido también

construir el diagrama de fases de los lipoplejos. Por último, con este modelo teórico se ha obtenido el valor de  $(L/D)_\phi$ , el cual ha sido corroborado con el determinado experimentalmente a partir de las medidas electroquímicas de potencial zeta y/o de espectroscopia de fluorescencia con EtBr.

El objetivo de este estudio ha sido analizar la influencia que tienen en las propiedades estructurales y biofísicas de los lipoplejos y en el grado de compactación y potencial transporte del DNA mediante este vector coloidal: *i*) la relación liposoma mixto-DNA,  $L/D$ , *ii*) el valor de  $L/D$  en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , del lipoplejo, *iii*) la fracción molar de lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y *iv*) la relación de carga,  $CR$ , entre el lípido catiónico y el DNA. El conjunto de resultados obtenidos han sido comparados con los obtenidos en el Art. 1 de esta Memoria para el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA. De este modo ha sido posible analizar también la influencia que produce en la compactación del DNA en forma de lipoplejos, el tipo, tamaño y forma de la cabeza polar y/o de la región hidrofóbica del lípido catiónico (CL). El conjunto de resultados obtenidos apuntan a que el liposoma mixto DOEPC/DOPE también constituye un vector coloidal potencialmente adecuado para la transfección del DNA.

Cite this: *Soft Matter*, 2011, **7**, 5991

www.rsc.org/softmatter

PAPER

## Gene vectors based on DOEPC/DOPE mixed cationic liposomes: a physicochemical study

Mónica Muñoz-Úbeda,<sup>a</sup> Alberto Rodríguez-Pulido,<sup>b</sup> Aurora Nogales,<sup>c</sup> Oscar Llorca,<sup>d</sup> Manuel Quesada-Pérez,<sup>e</sup> Alberto Martín-Molina,<sup>f</sup> Emilio Aicart<sup>a</sup> and Elena Junquera<sup>\*a</sup>

Received 28th February 2011, Accepted 8th April 2011

DOI: 10.1039/c1sm05352c

A double approach, experimental and theoretical, has been followed to characterize from a physicochemical standpoint the compaction process of DNA by means of cationic colloidal aggregates. The colloidal vectors are cationic liposomes constituted by a mixture of a novel cationic lipid, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (chloride salt) (DOEPC) and a zwitterionic lipid, the 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE). A wide variety of high precision experimental techniques have been used to carry out the analysis: electrophoretic mobility, small-angle X-ray scattering (SAXS), cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) and fluorescence spectroscopy (ethidium bromide intercalation assays). On the other hand, a theoretical model that considers the renormalization of charges of both the polyelectrolyte and the colloidal aggregates sheds light as well on the characteristics of the compaction process. This global information reveals that the compaction of DNA by the cationic liposomes is mostly driven by the strong electrostatic interaction among the positively charged surfaces of the colloidal aggregates and the negatively charged DNA, with a potent entropic component. DOEPC/DOPE liposomes are mostly spherical, with a mean diameter of around 100 nm and a bilayer thickness of 4.4 nm. From a morphological viewpoint, an appreciable amount of multilamellar structures has been found not only on the lipoplexes but also on the parent liposomes. The isoneutrality of the lipoplexes is found at liposome/DNA mass ratios that decrease with the molar fraction of cationic lipid in the mixed liposome ( $\alpha$ ). This liposome composition has a clear effect as well on the lipoplex structure, which goes from an inverted hexagonal phase ( $H_{II}$ ), usually related to improved cell transfection efficiency, at low cationic lipid molar fraction ( $\alpha \approx 0.2$ ), to a lamellar structure ( $L_{\alpha}$ ) when the cationic lipid content in the mixed liposomes increases ( $\alpha \geq 0.4$ ), irrespective of the lipoplex charge ratio. On the other hand, a theoretical complexation model is employed to determine the net charge of the lipoplexes studied in this work, by using renormalized charges. The model allows us to confirm and predict the experimental isoneutrality conditions as well as to determine the maximum magnitude of this charge as a function of the composition of the resulting lipoplexes.

<sup>a</sup>Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: junquera@quim.ucm.es; Web: <http://www.ucm.es/info/coloidal/index.html>; Fax: +34 913944135; Tel: +34 913944131

<sup>b</sup>Department of Polymer Chemistry, Zernike Institute for Advanced Materials, University of Groningen, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands

<sup>c</sup>Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, Serrano 121, 28006 Madrid, Spain

<sup>d</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

<sup>e</sup>Departamento de Física, Escuela Politécnica Superior de Linares, Universidad de Jaén, 23700 Linares, Jaén, Spain

<sup>f</sup>Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

## Introduction

In the last two decades, the interest in using synthetic non-viral vectors in gene delivery, as well as the publications from a large number of research groups, have dramatically increased.<sup>1–11</sup> One of the possible trails of this topic is based on the use of mixed lipids, constituted by a cationic and a zwitterionic lipid, to transfect genetic material forming what is known as lipoplexes.<sup>4,11–17</sup> The cationic lipid yields the positive charge to interact with both the negative delivery agent (*i.e.*, DNA) and the negative cellular membranes, while the zwitterionic lipid is a helper lipid that decreases the toxicity of the cationic lipid, increases the fluidity of the mixed lipid bilayer, and makes the fusion with the plasmatic membrane easier, which finally drives to a better efficiency in gene therapy transfection.<sup>1,3–8,18</sup> The



positive charge of the cationic surfactant has been provided not only by a univalent cationic lipid, but also by a divalent (gemini) or multivalent (dendritic) cationic lipid.<sup>4,10,11,19–31</sup> Although the electrostatic interaction between the cationic lipid and anionic DNA is expected to play a significant role in the lipoplex properties, it is necessary to increase the knowledge of this interaction not only from biochemical and chemical experiments but also from theoretical approaches.<sup>6,11</sup> It has been proved that a physicochemical study of the DNA compaction process by cationic lipids sheds light on both the formation of the lipoplex and on the transfection mechanisms.<sup>5,11,32</sup> In this sense, the surface charge density and the mixed lipid composition, together with the lipoplex structure seem to be the main factors influencing the lipoplex transfection efficiency.<sup>5,32</sup> Thus, lipoplexes may form lamellar, hexagonal, or even cubic structures that interact with the cell membranes in different ways and effectiveness,<sup>5,32</sup> and the objective is to conjugate mixed lipids that form stable lipoplexes with DNA, together with an easy release of DNA into the cells within which they are expected to be as less cytotoxic as possible. Previous studies<sup>5,12–14,17,32</sup> have shown a direct relation between the different structures found in the lipoplexes and the lipidic composition of the liposome. Therefore, it is important to carry out a complete study of the characteristics of novel lipoplexes at different lipid compositions, discovering the different structures developed by them and, accordingly, selecting the most promising vectors for gene therapy.

Due to its optimum properties as helper lipid, the 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE, see Scheme 1) is the most frequently used in transfection.<sup>4,33–41</sup> On the other hand, the 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (chloride salt) (DOEPC, see Scheme 1) is a cationic lipid belonging to the alkylated phospholipids family, normally used as a transfecting agent.<sup>42</sup> Both lipids contain two identical hydrocarbon chains with an unsaturation in the *cis* configuration at the 9 position that, compared to the saturated hydrophobic chains, increases the fluidity of both bilayers and, obviously, of the mixed cationic–zwitterionic membranes used as a vector in gene therapy. For all those reasons, we expect that the DOEPC/DOPE lipid mixture may be a potentially promising vector in gene therapy, and, accordingly, its physicochemical characterization in buffered solution in the absence (mixed liposomes) and in the presence (lipoplexes) of DNA becomes very interesting. The study reported in this work has been carried out by means of several experiments: electrochemical methods, such as zeta potential, are a powerful tool to analyze the electrostatic interactions on the surface of the liposomes and/or the

lipoplexes;<sup>4,38,43–47</sup> fluorescence ethidium bromide (EtBr) intercalation assays are used to check the DNA–liposome interaction, as well;<sup>38,46,48–58</sup> cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) experiments report information about the size, shape and morphology of mixed lipid vectors and lipoplexes,<sup>33,37,38,59–65</sup> while small angle X-ray scattering (SAXS) permits us to determine the structure of the lipoplexes.<sup>5,12–14,17,32</sup> Furthermore, the compaction process of DNA by the cationic lipids has been also theoretically analyzed, by using the DNA complexation model developed by Nguyen and Shklovskii and later modified by Sennato *et al.*<sup>66–68</sup> This theory was successfully employed in our previous works to study the phase diagrams of complexation of DNA with liposomes made of zwitterionic and cationic lipids.<sup>16,17</sup> However, the complexation model is employed at the present to determine the net charge of the lipoplexes studied in this work. In particular, the model allows comparing the maximum magnitude of this charge as a function of the composition of the resulting lipoplexes. Thus, the final objective of this work is to experimentally analyze and to theoretically predict the influence of the main factors that affect the DNA compaction process by mixed DOEPC/DOPE liposomes, as well as the characteristics of the resulting lipoplexes and their potential use in gene therapy.

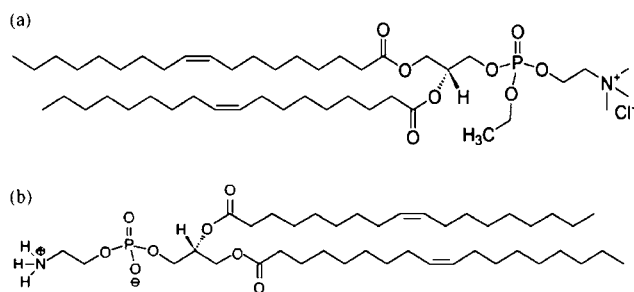
## Experimental section

### Materials

Cationic lipid, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (chloride salt) (DOEPC), and zwitterionic lipid 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE), were from Avanti Polar Lipids. Sodium salt of calf thymus DNA (CT-DNA) was from Sigma-Aldrich. All of them, with the best purities, were used as supplied by the manufacturer. Solutions were prepared with distilled and deionized water (Super Q Millipore system, conductivity lower than 18  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), and all were buffered with PBS buffer at around physiological conditions (pH = 7.5 and ionic strength of 160 mM). A protocol widely explained elsewhere<sup>15</sup> was used for the preparation of mixed liposome and lipoplex solutions. A stock solution of CT-DNA was prepared two days before the mixing with liposomes. DNA concentrations (expressed in mM base pairs) were determined by absorbance at 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}$ ).<sup>69,70</sup> A  $A_{260}/A_{280}$  ratio of 1.90 and a negligible absorbance at 320 nm ( $A_{320} = -0.003$ ) reveal<sup>39,69–71</sup> that the contamination of the DNA used in this work by the presence of a certain percentage of proteins is negligible.

### Experimental methods

The phase analysis light scattering technique (*Zeta PALS*, Brookhaven Instrum. Corp., USA) was used to measure electrophoretic mobilities (and from it, zeta potential) and particle sizes. This interferometric technique is up to 1000 times more sensitive than traditional light scattering methods based on the shifted frequency spectrum, and uses phase analysis light scattering to determine the electrophoretic mobility of charged colloidal suspensions. Each electrophoretic mobility data is taken as an average over 50 independent measurements. Electrophoretic mobility for liposome and lipoplex solutions was measured at each liposome composition (cationic to neutral lipid



**Scheme 1** (a) Cationic lipid molecule, DOEPC; and (b) zwitterionic lipid molecule, DOPE.

ratios) as a function of lipoplex compositions (liposome to DNA ratios).

Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were carried out on a Bruker AXS nanostar small-angle X-ray scattering instrument. The instrument uses Cu K $\alpha$  radiation (1.54 Å) produced in a sealed tube. Samples were placed in sealed glass capillaries purchased from Hilgenberg with an outside diameter of 1.5 mm and wall thickness of 0.01 mm. The sample chamber is under vacuum. The scattered X-rays are detected on a two-dimensional multiwire area detector (Bruker Hi-Star) and converted to one-dimensional scattering by radial averaging and represented as a function of momentum transfer vector  $q$  ( $=4\pi \sin \theta/\lambda$ ) in which  $\theta$  is half the scattering angle and  $\lambda$  is the wavelength of the incident X-ray beam. The sample to detector distance was 0.63 m. Measurements on each sample were collected over 4 cycles of 30 min each, to ensure the stability of the lipoplexes. SAXS experiments were run at three different lipoplex compositions in the whole range of molar fraction of cationic lipid in the mixed liposome.

Transmission electron microscopy (TEM) experiments were performed under liquid nitrogen temperatures (cryo-TEM). Samples of mixed liposomes in the absence and presence of DNA at different liposome compositions, and always above the isoneutrality point of the lipoplex, were deposited on QUANTI-FOIL® R 1.2/1.3 grids (<http://www.quantifoil.com/>) after glow discharge and rapidly vitrified in liquid nitrogen using a GATAN plunger. Grids were then observed in a JEOL JEM-1230 microscope with the temperature maintained at  $-180^\circ\text{C}$  using a GATAN cryo-holder. Micrographs were recorded using a  $4\text{k} \times 4\text{k}$  TemCam-F416 camera (TVIPS). Magnifications for each camera frame varied from 10 000 to 30 000. The final sampling of each image measured in nm per pixel was calibrated using catalase crystals at each of the magnifications used. Images of individual liposomes were boxed and clipped from micrographs using the command “boxer” found in the EMAN software for image processing and the boxed images were saved as .png files. These images were visualised and filtered with “ImageJ” (Image processing and analysis in Java). A line was drawn through a desired section of each image and its profile plotted and represented using ImageJ.

Fluorescence emission spectra of ethidium bromide in the 530–700 nm region were recorded with excitation at 520 nm (the molar extinction coefficient is the same at 520 nm for free and DNA-associated EtBr) by using a Perkin Elmer LS-50B Luminescence Spectrometer.<sup>72–75</sup> A 10 mm stoppered rectangular silica cell was placed in a stirred cuvette holder whose temperature was kept constant at  $298.15 \pm 0.01$  K. Probe concentration was kept constant at  $[\text{EtBr}] = 62.9 \mu\text{M}$  in all the cases. Two sets of experiments were done: (i) the emission of a EtBr/DNA solution was registered at increasing liposome concentrations by adding a EtBr/DNA/liposome solution, thus covering a wide range of lipoplex compositions (in both solutions, DNA : EtBr molar ratio is 6 : 1 and  $[\text{DNA}] = 0.025 \text{ mg mL}^{-1}$ ; and (ii) EtBr emission is measured as long as liposome concentration increases by adding an EtBr/liposome solution (blank tests). These experiments were done at different mixed liposome compositions, covering the whole composition range. In all the cases, excitation and emission band slits were fixed at 2.5 and 5 nm, respectively, scan rate was selected at  $240 \text{ nm min}^{-1}$ .

## Theoretical background

As in previous works,<sup>16,17</sup> the complexation of liposomes and DNA in aqueous solution has been theoretically studied by using the formalism developed by Nguyen and Shklovskii and later modified by Sennato *et al.*<sup>66–68</sup> This phenomenological theory describes the complexation of a long flexible polyelectrolyte of charge  $-q$  with oppositely charged spherical particles, such as liposomes or micelles, with charge  $Q$ . To this end, the authors provide the free energy of the system as a sum of the free energy related to the complexes, to the aggregates and to the remaining free polyelectrolyte in the solution. These free energies in turn depend on the fraction of polyelectrolyte in the aggregates and the number of polyelectrolytes bound to a polyelectrolyte-coated liposome complex.<sup>68</sup> After minimizing the free energy of the system, the authors reach a set of equations that allows for the calculation of the boundaries of the region where complexes begin to condense, forming larger aggregates, and where aggregates dissolve again (re-entrant condensation). This formalism was employed in our previous works to build the complexation phase diagrams describing the condensation and re-entrant condensation behavior of different liposome–DNA complexes, as a function of the liposomes–DNA ratio.<sup>16,17</sup>

Herein, the theory is employed to determine the net charge of the lipoplexes studied in the present work. If we designate the number of DNA segments bound to a liposome as  $N$ , the charge of the lipoplexes can be defined as:  $Q^* = Q - qN$ . As a consequence of minimizing the free energy of the system, the values of  $Q^*$  for concentrations around the isoneutrality point are calculated by using the following equation proposed by Nguyen and Shklovskii<sup>67</sup> and particularized for the case of a fixed DNA concentration:

$$\frac{Q^*}{Q} = \frac{k_B T C}{q Q} \ln \left( 1 + \frac{S - S_0}{S_0} \right) \quad S_a \leq S \leq S_d \quad (1)$$

where  $S$  is the liposome concentration,  $S_a$  and  $S_d$  being the boundary liposome concentrations at which the system begins to be unstable and to be re-stabilized, respectively. For values of  $S$  out of the range  $[S_a, S_d]$ , the ratio  $Q^*/Q$  tends to  $Z = \mp \sqrt{E_0 2C/qQ}$ , when  $S$  tends to  $S_a$  and  $S_d$ , respectively. In these equations,  $k_B T$  is the thermal energy and  $C$  is the electrical capacitance. In the case of a dispersion of spherical particles of radius  $a$  immersed in an electrolytic solution characterized by a reciprocal Debye length ( $\kappa_D$ ) the electrical capacitance can be calculated as  $C = 4\pi\epsilon_0\epsilon a(1 + \kappa_D a)$ ,  $\epsilon_0$  and  $\epsilon$  being the vacuum and the relative permittivity, respectively. On the other hand,  $E_0$  and  $S_0$  are two phenomenological parameters. The former is related to the energy gained per complex by forming the aggregates (compared to a free neutral isolated liposome–DNA complex in solution) whereas  $S_0$  is related to the isoneutrality liposome concentration (*i.e.* the liposome concentration at which the charge of the complexes is zero). If the liposome concentrations  $S_a$  and  $S_d$  are known, the phenomenological parameters can be analytically estimated from:<sup>67</sup>

$$S_{a,d} = S_0 \exp \left( \mp \sqrt{\frac{E_0 2qQ}{(k_B T)^2 C}} \right) \quad (2)$$

Although the Nguyen and Shklovskii complexation model fits qualitatively well with the experimental results, Sennato *et al.*

pointed out that the theoretical description can be significantly enhanced if the Manning counterion condensation effect is taken into account. Although the Manning counterion condensation effect has been extensively analyzed in computer simulation studies of polyelectrolyte adsorption on charged particles,<sup>76–79</sup> Sennato *et al.* proposed to include the Manning counterion condensation effect in the calculations by using theoretical renormalized charges of liposomes ( $Q_{\text{ren}}$ ) and DNA molecules ( $q_{\text{ren}}$ ), instead of the charges based on a full ionization of their charged groups (usually denoted as bare charges).<sup>68</sup> In the case of the renormalization of the liposome charge, the authors provide a simple expression that depends on the liposome's volume fraction. In order to improve the results of Sennato *et al.* we propose a more complex renormalization calculation based on the *jellium* model that has been successfully applied in previous works for the estimation of renormalization charges of liposomes and latex particles.<sup>80,81</sup> The idea is to use the classical theory of colloidal stability (DLVO theory) to predict the effective interaction pair potential between two colloids but using a renormalized charge instead of the bare charge of colloids. The whole process is detailed in the cited references and basically starts with the Poisson–Boltzmann (PB) equation for the normalized electrostatic potential in terms of the colloid bare charge. The resulting second order differential equation is solved together with the boundary conditions at the infinite distance (potential is zero) and at distance of a particle radius by applying Gauss's laws. Then the far-field solution of this equation is matched with the solution of a linearized PB equation in which the value of  $Q_{\text{ren}}$  is used instead of  $Q$ . In the case of the DNA charge, the renormalization process employed in this work will be the same as Sennato *et al.* for a general charged polyion:  $q_{\text{ren}} \approx l_B/l_B$  where  $l_B$  is the Bjerrum length  $l_B = e^2/(4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T)$ ,  $e$  being the elementary unit of charge.<sup>68</sup>

## Results and discussion

### Liposome–DNA interaction

It has been shown that both the composition of the mixed liposome and that of the lipoplex have a clear effect on the resulting lipoplex characteristics. For that reason, this work presents a detailed study where both compositions (liposome and lipoplex) are varied, and their effect on the resulting physico-chemical properties is analyzed. Usually, liposome composition is given in terms of molar fractions ( $\alpha$ ) while either the mass ratio ( $L/D$ ) or the charge ratio (CR) is used to define the composition of the lipoplex. These latter quantities, although referred to the same magnitude, are different since  $L/D$  involves the neutral helper lipid, while CR does not. The following equations are used in this work to calculate all the abovementioned ratios:

$$\alpha = \frac{n_{L^+}}{n_{L^+} + n_{L^0}} \quad (3)$$

$$\frac{L}{D} = \frac{L^+ + L^0}{D} \quad (4)$$

$$\text{CR} = \frac{n^+}{n^-} = \frac{L^+/M_{L^+}}{2D/\bar{M}_{\text{bp}}} \quad (5)$$

where  $n_{L^+}$  and  $n_{L^0}$  stand for the number of moles of cationic and zwitterionic lipids, respectively;  $n^+$  and  $n^-$  are the number of moles of positive and negative charges, coming from cationic lipid and DNA, respectively;  $L^+$  and  $L^0$  are the masses of cationic and zwitterionic lipids (thus,  $L = L^+ + L^0$  is the total mass of lipid);  $M_{L^+}$  is the molar mass of cationic lipid and  $\bar{M}_{\text{bp}}$  is the average molar mass per DNA base pair.

Among all the possible  $L/D$  ratios, there is one with a special significance, the so-called isoneutrality point ( $(L/D)_\phi$ ) that is defined as the  $L/D$  ratio at which the positive charges of the liposomes neutralize the negative charges coming from the phosphate groups of DNA (*i.e.* the charge ratio of the lipoplexes (CR) equals 1 in eqn (5)). This parameter marks the lower limit of lipoplex compositions from which the net charge of the lipoplex is positive, thus becoming a potentially adequate cell transfecting agent. Three different methods have been used in this work to determine the isoneutrality point: (i) through electrochemical properties, such as, electrophoretic mobility ( $\mu_E$ ), zeta potential ( $\zeta$ ) or the surface charge density enclosed by the shear plane ( $\sigma_\zeta$ ) since all of them show an inversion of sign at this particular  $L/D$  value;<sup>16</sup> (ii) through fluorescence spectroscopy, by means of EtBr intercalation assays, since the maximum fluorescence intensity of the probe decreases as long as it is displaced from the hydrophobic interior of DNA helix to the bulk when the lipoplex is formed, reaching negligible values (characteristic of the probe in the bulk) at the isoneutrality of the complex; and (iii) by using the theoretical model described in the previous section.

Both studies (electrochemical and spectroscopic) were run on DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes with different DOEPC contents ( $\alpha = 0.25, 0.5, 0.75$  and 1) and within a  $L/D$  range that always includes the electroneutrality ratio,  $(L/D)_\phi$ . Table 1 reports the electrophoretic data,  $\mu_E$ ,  $\zeta$  and  $\sigma_\zeta$ , for all these lipoplexes. Fig. 1 shows, as an example,  $\zeta$  potential values as a function of  $L/D$  ratios, for the highest ( $\alpha = 1$ ) and the lowest ( $\alpha = 0.25$ ) content of DOEPC in the mixed liposome, among those studied in this work. In all the cases,  $\zeta$  potential has been obtained from electrophoretic mobility by using the well known Henry equation:

$$\zeta = \frac{3\eta}{2\epsilon_0\epsilon_r f(\kappa_D a)} \mu_E \quad (6)$$

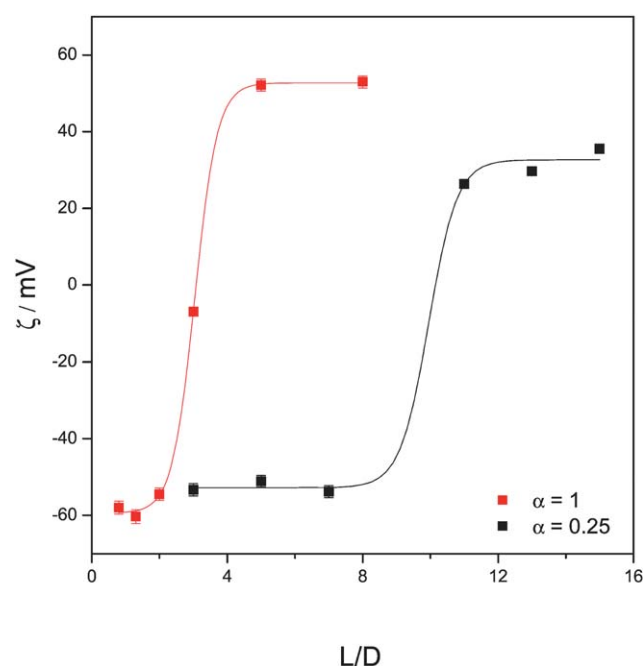
where  $\eta$  is the viscosity of water ( $8.904 \times 10^{-4} \text{ N m}^{-2} \text{ s}$  at 298.15 K);  $\epsilon_0$  and  $\epsilon_r$  are the vacuum and relative permittivity ( $8.854 \times 10^{-12} \text{ J}^{-1} \text{ C}^2 \text{ m}^{-1}$  and 78.5, respectively); and  $f(\kappa_D a)$  the Henry function, that depends on the reciprocal Debye length,  $\kappa_D$ , and the hydrodynamic particle radius ( $a$ ). For medium-to-large particles in a medium of moderate ionic strength ( $a \gg \kappa_D^{-1}$ ), the Smoluchowski limit is usually applied ( $f(\kappa_D a) = 1.5$ ) to estimate the Henry function.<sup>82,83</sup> Two characteristic sigmoid curves can be observed in Fig. 1, with an inversion of sign taking place at higher  $(L/D)_\phi$  values as long as DOEPC content decreases for a constant DNA concentration, as could be expected. The electrostatic character of the interaction that takes place between the positively charged surface of the liposome and the negatively charged DNA helix, with the release of chloride and sodium counterions from cationic lipid and DNA phosphates, respectively, being the entropic driving force, accounts for this inversion of sign. It is also known that electrostatics plays an important role as well in various steps of the transfection process.<sup>5,28,32</sup>

**Table 1** Values of electrophoretic mobility ( $\mu_E$ ), zeta potential ( $\zeta$ ) and surface density charge (at the shear plane) ( $\sigma_s$ ) at a series of mixed liposome composition ( $\alpha$ ) and, within each composition, at different values of  $L/D$  mass ratios, for DOEPC/DOPE/CT-DNA lipoplexes. DNA concentration was kept constant at  $0.049 \pm 0.001 \text{ mg mL}^{-1}$ <sup>b</sup>

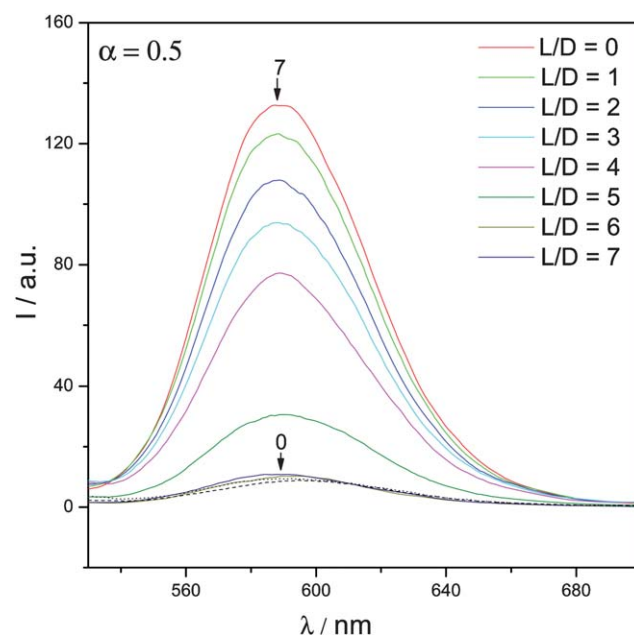
| $L/D$           | $\mu_E \times 10^8 / \text{m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ | $\zeta / \text{mV}$ | $10^3 \sigma_s / \text{cm}^{-2}$ |
|-----------------|--|---------------------|----------------------------------|
| $\alpha = 0.25$ |  |                     |                                  |
| 3.0             | -4.12  | -53.4               | -18.6                            |
| 5.0             | -4.18  | -54.2               | -19.0                            |
| 7.0             | -4.16  | -53.9               | -18.8                            |
| 11.0            | 2.03   | 26.3                | 8.1                              |
| 13.0            | 2.32   | 29.7                | 9.6                              |
| 15.0            | 2.99   | 35.5                | 11.3                             |
| $\infty^a$      | 2.07   | 26.8                | 8.2                              |
| $\alpha = 0.50$ |  |                     |                                  |
| 1.5             | -3.98  | -51.6               | -17.8                            |
| 3.0             | -3.90  | -50.6               | -17.4                            |
| 4.0             | -3.85  | -49.9               | -17.0                            |
| 6.0             | 1.52   | 19.7                | 5.9                              |
| 7.0             | 2.36   | 30.6                | 9.5                              |
| 9.0             | 3.22   | 41.7                | 13.6                             |
| $\infty$        | 2.91   | 37.7                | 12.1                             |
| $\alpha = 0.75$ |  |                     |                                  |
| 1.0             | -4.44  | -57.6               | -20.6                            |
| 2.0             | -4.26  | -55.3               | -19.6                            |
| 3.0             | -4.37  | -56.6               | -20.1                            |
| 5.0             | 3.62   | 46.9                | 15.7                             |
| 7.0             | 3.79   | 49.1                | 16.7                             |
| 9.0             | 3.91   | 50.7                | 17.4                             |
| $\infty$        | 3.06   | 39.7                | 12.9                             |
| $\alpha = 1$    |  |                     |                                  |
| 0.8             | -4.47  | -58.0               | -21.6                            |
| 1.3             | -4.65  | -60.3               | -22.0                            |
| 2.0             | -4.20  | -54.5               | -19.1                            |
| 3.0             | -0.54  | -7.00               | 2.06                             |
| 5.0             | 4.02   | 52.1                | 18.0                             |
| 8.0             | 4.09   | 53.0                | 18.6                             |
| $\infty$        | 4.33   | 56.1                | 20.1                             |

<sup>a</sup> Mixed liposomes in the absence of DNA. <sup>b</sup> Errors are estimated to be around 3% in electrophoretic mobility and zeta potential and around 6% in surface density charge.

EtBr intercalation assays are very often used to confirm and characterize this surface electrostatic interaction, as well as to determine the isoneutrality point of the complex. EtBr is an aromatic planar cationic fluorophore whose fluorescence intensity clearly increases when it is intercalated between base pairs of double-stranded DNA.<sup>84–88</sup> Fig. 2 shows the fluorescence of EtBr, at constant DNA concentration, at different  $L/D$  ratios for DOEPC/DOPE-DNA lipoplexes at  $\alpha = 0.5$ , as an example (similar figures have been obtained at other lipid compositions). Also included in the figure is the EtBr fluorescence in the absence of DNA (dashed line) and also in the absence of liposomes (dotted line). A characteristic  $\pi$ - $\pi^*$  band, centered at around 588 nm, can be observed in all the cases. It is clear from the figure that the emission of EtBr in the presence of liposomes, but in the absence of DNA, is negligible and comparable to that in the bulk, indicating that the probe does not interact with the cationic liposomes, as also found for other lipoplexes and surfoplexes.<sup>15,16,38,48,50,51</sup> Two complementary analyses have been done: (i) one follows the emission intensity at the maximum wavelength, as a function of  $L/D$ ; and (ii) alternatively, the  $\pi$ - $\pi^*$  bands have been deconvoluted, following a procedure widely explained in a previous work,<sup>15</sup> into overlapping gaussian curves



**Fig. 1** Plot of zeta potential ( $\zeta$ ) as a function of lipoplex composition ( $L/D$ ) for lipoplexes with  $\alpha = 0.25$  and 1, in aqueous buffered medium (PBS 160 mM, pH = 7.5) at 298.15 K. Solid line: sigmoidal fit of experimental values. Errors are estimated to be around 3%. DNA concentration was kept constant at  $0.049 \text{ mg mL}^{-1}$  and the total lipid concentration was varied, depending on the lipid composition, to cover a wide  $L/D$  ratio range.



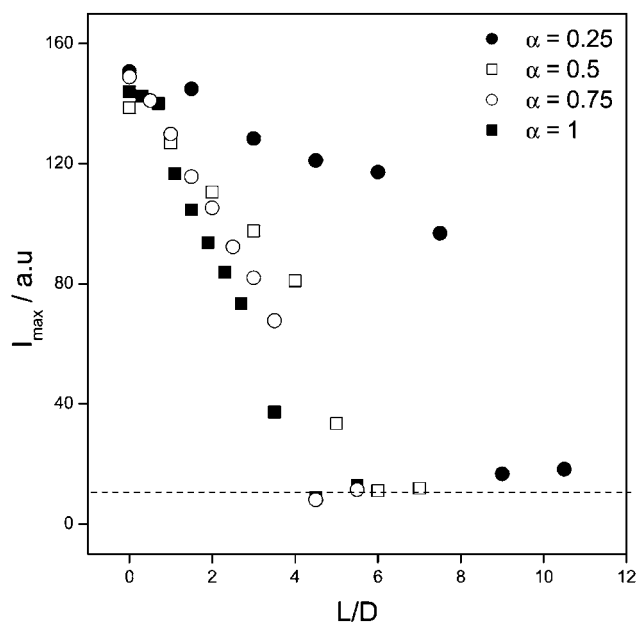
**Fig. 2** Emission fluorescence spectra of EtBr in the presence of DOEPC/DOPE-DNA lipoplexes at  $\alpha = 0.5$  and different  $L/D$  ratios: 0,  $L/D = 0$ ; 1,  $L/D = 1.0$ ; 2,  $L/D = 2.0$ ; 3,  $L/D = 3.0$ ; 4,  $L/D = 4.0$ ; 5,  $L/D = 5.0$ ; 6,  $L/D = 6.0$ ; 7,  $L/D = 7.0$ ; dotted line shows the emission fluorescence spectra of EtBr in the absence of liposomes and lipoplexes; and dashed line shows the emission fluorescence spectra of EtBr only in the presence of liposomes ( $L/D = \infty$ ). Medium: aqueous PBS 160 mM, pH = 7.5. DOEPC : DOPE ratio is 1 : 1; DNA : EtBr ratio is 6 : 1; [DNA] =  $0.025 \text{ mg mL}^{-1}$ .



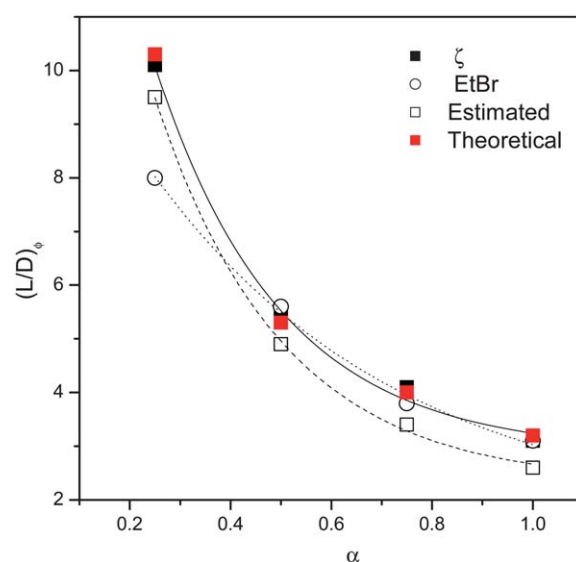
with a non-linear least-squares multi-peaks fitting procedure, each of which being attributed to the  $\pi$ - $\pi^*$  emission of the probe immersed within different microenvironments, characterized by its hydrophobicity, microviscosity, rigidity and/or solvation features.

Fig. 3 shows the maximum emission intensity of EtBr, found at  $\lambda = 588$  nm, as a function of  $L/D$ , at all the  $\alpha$  compositions studied herein. It is remarkable that probe emission shows clear changes when DNA is present, gradually decreasing with  $L/D$  from a maximum initial value, for the probe intercalated within the DNA strands, down to a constant intensity, comparable to the one found in the absence of DNA (dashed line) and even in the absence of liposomes. This behaviour confirms that DNA is compacted by the cationic surface of the liposome with an interaction that is stronger than that between EtBr and DNA, the probe being displaced by the addition of lipid from the DNA base pair hydrophobic microenvironment towards the bulk, where its quantum fluorescence yield falls down. Curves in Fig. 3 allow us to determine the isoneutrality points of the lipoplexes at different  $\alpha$  values, by applying Phillip's method.<sup>89</sup> Fig. 4 summarises these  $(L/D)_\phi$  ratios, obtained from both the electrochemical and the spectroscopic experiments, together with those previously estimated with eqn (5) for CR = 1. It is remarkable the good concordance among all of these results. A similar behaviour was found in a previous study.<sup>17</sup>

Following the alternative approach, one can expect the EtBr to be immersed within two different microenvironments in the presence of DNA (the helix interior, more hydrophobic, and the buffered bulk, more polar), while in the absence of DNA it remains in only one microenvironment, the bulk. Fig. 5 shows a summary of the deconvolution process into the best



**Fig. 3** Emission fluorescence intensity of EtBr at 588 nm in the presence of DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes as a function of  $L/D$  ratio at different mixed liposome compositions,  $\alpha = 0.25, 0.5, 0.75$  and 1. Medium: aqueous PBS 160 mM, pH = 7.5. DNA : EtBr ratio is 6 : 1; [DNA] = 0.025 mg mL<sup>-1</sup>. Dashed line shows an example of the emission fluorescence spectra of EtBr only in the presence of liposomes.



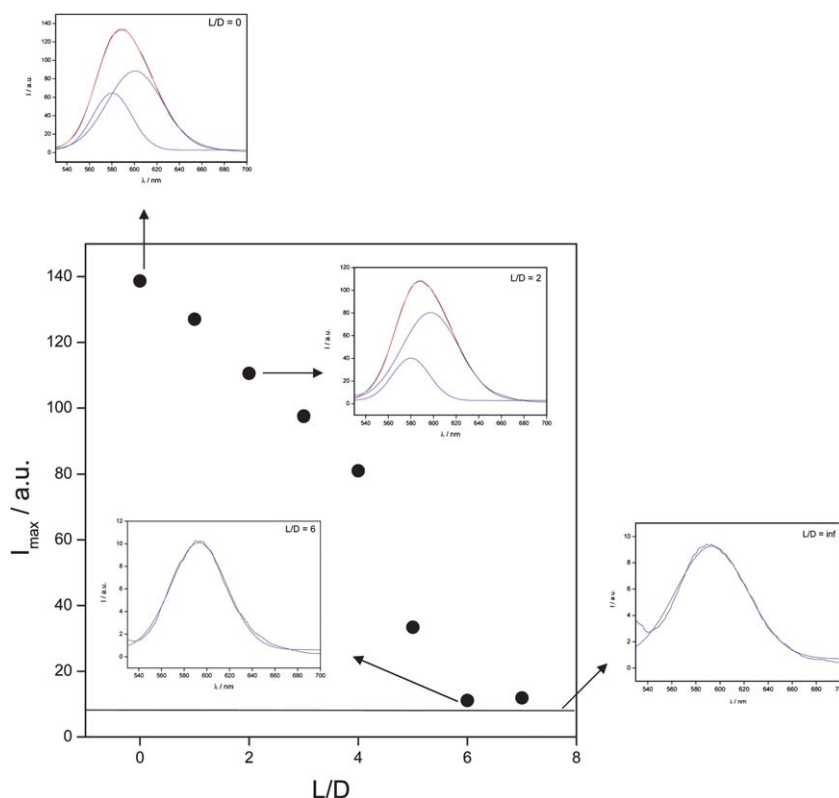
**Fig. 4** Plot of isoneutrality  $L/D$  ratios  $(L/D)_\phi$  as a function of mixed liposome composition in terms of molar fractions ( $\alpha$ ). The figure shows the results obtained from electrophoretic measurements and EtBr intercalation assays, together with those estimated with eqn (3) and those calculated with the theoretical model.

components (one or two gaussians) at a selection of the  $L/D$  ratios ( $L/D = 0$ , i.e. EtBr/DNA;  $(L/D) < (L/D)_\phi$ ;  $(L/D) > (L/D)_\phi$ ; and  $L/D = \infty$ , i.e. EtBr/liposomes) for DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes at  $\alpha = 0.5$  ( $(L/D)_{\phi,\zeta} = 5.4$ ), as an example. A similar behaviour has been found at all mixed liposome compositions ( $\alpha$ ). The figure confirms this transition, from two microenvironments at  $L/D = 0$ , to one microenvironment when EtBr is totally displaced from DNA interior towards the bulk, i.e. at  $L/D > (L/D)_\phi$ . Moreover, Fig. 6, that shows a plot of the areas of the gaussians above commented as a function of the  $L/D$  ratio, is consistent with this reasoning:  $A_1$  (blue shifted gaussian, helix interior) decreases while  $A_2$  (red shifted gaussian, bulk) increases with  $(L/D)$  confirming that the probe content decreases inside the helix and increases in the bulk as long as the lipoplex is formed.

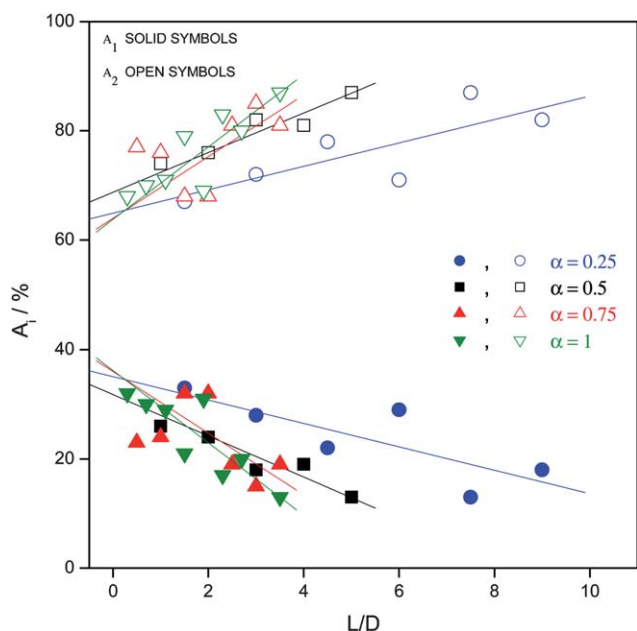
### Structure and morphology of DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes

Lipoplex structure, size and morphology are known to be key factors influencing transfection efficiency.<sup>8</sup> In this section, DOEPC/DOPE liposomes, in the absence and in the presence of DNA, are studied by means of cryo-TEM and SAXS experiments. PALS technique also allows for the determination of the sizes of mixed liposomes; the same  $\alpha$  compositions as those studied in the electrochemical experiments were measured. Hydrodynamic diameters of  $(95 \pm 8)$ ,  $(120 \pm 10)$ ,  $(106 \pm 9)$ , and  $(110 \pm 10)$  nm were obtained at  $\alpha = 0.25, 0.5, 0.75$ , and 1, respectively. These sizes are consistent with the sequential extrusion protocol applied in this work and also in good agreement with cryo-TEM results, as follows.

Cryo-TEM experiments were run for liposomes with  $\alpha = 0.25, 0.5, 0.75$ , and 1, and the corresponding lipoplexes with  $L/D$  above  $(L/D)_\phi$  in each case. Fig. 7 shows a selection of cryo-TEM micrographs among those taken for the liposomes at  $\alpha = 1$ , as an example. These images reveal that the liposomes studied herein



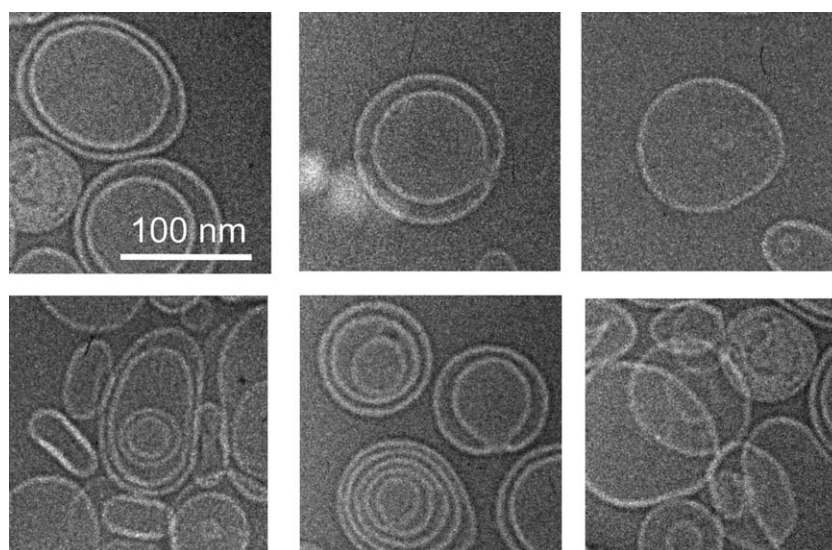
**Fig. 5** Emission fluorescence spectra of EtBr in the presence of DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes at  $\alpha = 0.5$  and at a selection of  $L/D$  ratios, together with their deconvolutions into 1 or 2 gaussian components:  $L/D = 0$ , only DNA;  $L/D = 2.0$ , below  $(L/D)_\phi$ ;  $L/D = 6$ , above  $(L/D)_\phi$ ; and  $L/D = \infty$ , only DOEPC/DOPE liposomes. Black line: experimental spectra. Blue lines: gaussian components. Red line in 2 gaussian cases: total sum of gaussian components. Medium: aqueous PBS 160 mM, pH = 7.5.



**Fig. 6** Plot of the areas (in terms of % of the total area) of gaussian bands as a function of  $L/D$  ratios for DOEPC/DOPE–DNA (solid symbols ( $A_1$ ) and open symbols ( $A_2$ )) at different mixed liposome compositions,  $\alpha = 0.25, 0.5, 0.75$  and 1.

are mostly spherical, with an average diameter of around  $(100 \pm 10)$  nm and a bilayer thickness of  $(4.4 \pm 0.5)$  nm, both parameters averaged over the structures found in all the micrographs (not only over those shown herein). It is remarkable that, in contrast to what was found in previous studies<sup>15–17,90</sup> where liposomes were mostly unilamellar, an appreciable percentage of multilamellar structures can be observed in the present case, together with a remarkable increase in the flexibility of the membranes that justify the presence of looped, twisted and invaginated structures. This feature is consistent with the structure of the DOEPC molecule that, as in the case of DOPE (see Scheme 1), has a single olefinic unsaturation in the *cis* configuration at the 9 position in the two 18C hydrocarbon chains. In fact, it has been demonstrated that the presence of this double bond is responsible for the low  $T_m$  of these lipids ( $T_m$  for DOPE is around  $-16^\circ\text{C}$ ), and, accordingly, of their abilities as fusogenic lipids. It is then expected that DOEPC/DOPE liposomes would show improved characteristics as gene vectors.

Cryo-TEM experiments were also run on positively charged lipoplex samples, *i.e.* at  $(L/D)$  ratios above  $(L/D)_\phi$ . Fig. 8 shows a gallery of selected micrographs of DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes at the different  $\alpha$  compositions studied in this work. Compared with the micrographs in Fig. 7, it can be clearly seen that lipoplexes are more condensed than liposomes, with an accumulation of density on the surface. It is remarkable that the neat characteristic contrast between the line representing the lipidic bilayer and the interior of the liposomes has been lost in



**Fig. 7** Details extracted from the original cryo-TEM micrographs of liposomes in the absence of DNA, *i.e.* at  $L/D = \infty$  and  $\alpha = 1$ . Scale bar: 100 nm.

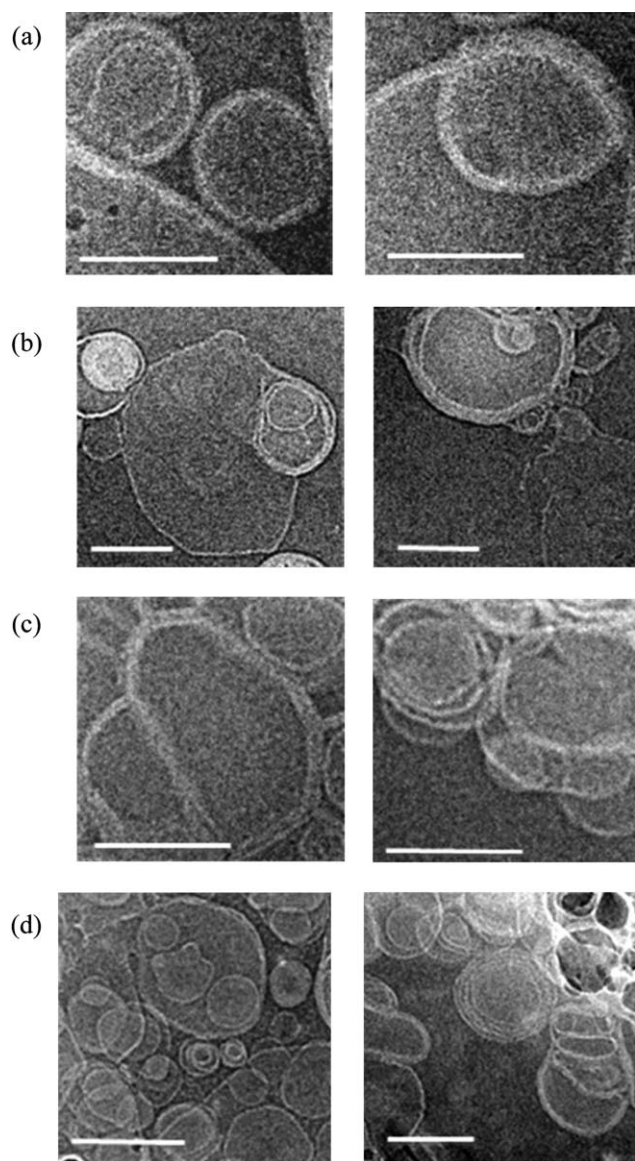
most cases. These features confirm that DNA is compacted at the surface of liposomes by means of a strong electrostatic interaction, as corroborated by zeta potential and fluorescence results. As can be seen in the figure, multilamellar structures are found as well in the case of lipoplexes. However, note that these structures are different than those found for multilamellar liposomes in Fig. 8. Some of those micrographs, where multilamellar onion-type lipoplexes are observed, were chosen to analyze the presence of possible patterns of periodicity that would confirm the regular arrangement of the multilamellae. These selected micrographs were analyzed with the image processing protocol explained in the Experimental section. Thus, a solid line was drawn perpendicular to the membranes to plot the variations in density, which appear as different grey levels in the TEM images. Fig. 9 shows a plot of grey levels *vs.* distance along the line drawn in panel A as represented by ImageJ (Image processing and analysis in Java), for  $\alpha = 0.5, 0.75$  and 1. The maximum and minimum levels of density revealed a clear pattern and the average distance between peaks, measured in pixels, was calculated and transformed in nm using the nm per pixel scale for each image. As can be seen in Fig. 9, a complex profile with several peaks and a wider dimension indicates the presence of several layers. Averaged interlamellar spacings of  $(6.7 \pm 0.4 \text{ nm})$ ,  $(6.9 \pm 0.3 \text{ nm})$ , and  $(7.2 \pm 0.3 \text{ nm})$ , respectively, confirms the compaction of DNA helices on a multilamellar sandwiched structure ( $\sim 4.4 \text{ nm}$  per bilayer +  $\sim 2.5 \text{ nm}$  per DNA helix), although a more precise and detailed analysis will be presented in the following section where SAXS experiments are reported.

The structures of the cationic lipoplexes were also investigated by SAXS. The experiments were carried out covering the whole composition range of the lipid composition,  $\alpha$ , at three charge ratios, CR ( $=3, 5$  and  $7$ ). Fig. 10a–c show all SAXS diffractograms, the intensity being plotted *vs.*  $q$  factor. Bragg peaks show that, for  $\alpha \geq 0.4$ , lipoplexes form a lamellar structure,  $L_\alpha$ , according to Scheme 2 (three related sharp peaks have been found for each diffractogram) with an interlayer distance ( $d$ ) related to the  $q$  factor of the first peak ( $d = 2\pi/q_{100}$ ). Thus, lipoplexes may be represented as alternating layers of mixed lipids

and DNA helices, where  $d (=d_m + d_w)$  is the sum of the thicknesses of the lipid bilayer ( $d_m$ ) and the DNA aqueous layer ( $d_w$ ). Accordingly, the Bragg peak on each diffractogram not corresponding to the lamellar structure arises from the DNA–DNA correlation, and, from  $q_{\text{DNA}}$  factor, DNA strands separation in the monolayer,  $d_{\text{DNA}} (=2\pi/q_{\text{DNA}})$ , can be calculated (see Scheme 2). In those cases where peaks are difficult to see, a protocol based on the second derivative of the intensity was applied in the region where the peak is expected. Plots of the periodic distance of the lamellar structure ( $d$ ) *vs.*  $\alpha$ , at the three charge ratios, reported in Fig. 11, indicate that  $d$  remains constant within an average value of  $(6.6 \pm 0.2) \text{ nm}$ . This feature is due to the fact that DOEPC and DOPE lipids have a hydrophobic region of identical length (Scheme 1), and the thickness of the mixed lipid bilayer ( $d_m$ ) must not change with the lipid composition. If a value of  $d_m \approx 4.4 \text{ nm}$  is assumed, a thickness of the DNA monolayer,  $d_w (=2.2 \pm 0.2) \text{ nm}$ , independent of  $\alpha$ , and CR, is obtained, completely consistent with the presence of a monolayer of the hydrated DNA helices. The results for  $d$  and  $d_m$  of the lamellar structure are consistent with those obtained from cryo-TEM experiments. Furthermore, Fig. 12 shows how the separation between the DNA helices,  $d_{\text{DNA}}$ , slightly decreases with  $\alpha$  at the three charge ratios, since one would expect that, at constant CR,  $d_{\text{DNA}}$  should decrease as the cationic lipid content increases in the lipoplex ( $\alpha$ ) a behavior already reported in the literature for other lipoplexes.<sup>91</sup> Table 2 summarises all the results obtained for  $d$  and  $d_{\text{DNA}}$ . In addition, SAXS results are in good agreement with reported cryo-TEM micrographs, and confirm the presence of multilamellar structures for DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes above the isoneutrality.<sup>90</sup> Similar conclusions were also extracted for other lipoplexes reported previously by us.<sup>15,16</sup>

Nevertheless, the Bragg peaks observed on the SAXS diffractogram at  $\alpha = 0.2$  of Fig. 10a–c, index nicely on a 2D hexagonal lattice,  $H_{II}$ , similar to the one shown in Scheme 2. The spacing of the cell unit can be also directly related to the  $q$  factor ( $d = d_{\text{DNA}} = 4\pi/(3^{1/2})q_{10}$ ). In this lattice, a monolayer of mixed lipids with the zwitterionic DOPE as the main component,





**Fig. 8** Details extracted from the original cryo-TEM micrographs of DOEPC/DOPE-DNA lipoplexes at  $L/D > (L/D)_\phi$ : (a)  $\alpha = 0.25$ ; (b)  $\alpha = 0.5$ ; (c)  $\alpha = 0.75$  and (d)  $\alpha = 1$ . Scale bar: 100 nm in (a) and (c); 200 nm in (b) and (d).

surrounds the DNA helices, the structure of the DNA-mixed lipids resembling inverted cylindrical micelles. The constant value of  $(7.8 \pm 0.2)$  nm obtained for  $d (=d_{\text{DNA}})$ , at the three charge ratios (see Fig. 11), indicates that the periodicity of the lipid structure is higher in the hexagonal packing than in the lamellar one. Moreover, since  $d = d_{\text{DNA}}$  for  $H_{\text{II}}$  phase, it can be concluded as well that DNA helices are more separated than in the  $L_\alpha$  phase, where  $d_{\text{DNA}}$  values fall around 5 nm (see Fig. 12). In any case, and taking into account the lipid chain lengths, the diameter inside the inverted micelle cylinder (equivalent to  $d_w$  in the lamellar structure) is  $(3.6 \pm 0.2)$  nm, enough to host the hydrated DNA helices.

It has been confirmed<sup>5,20,92</sup> that, in the early stage of the transfection, the interaction between positive lipoplexes and anionic membranes is strongly dependent on the lipoplex

structure. In fact, lamellar lipoplexes captured by endosomal vesicles remain stable the DNA release being relatively low, while hexagonal lipoplexes rapidly fused with the anionic endosomal vesicle, provoking a loosening of the lipoplex condensed structure, and accordingly, DNA is easily released to the cytoplasm,<sup>20</sup> with proved better efficiency in transfection than lamellar ones.<sup>92,93</sup> Accordingly, it could be concluded that the DOEPC/DOPE-DNA lipoplex studied in this work, is potentially an adequate gene vector when the cationic lipid content is moderate-to-low, since above the isoneutrality an inverted hexagonal phase has been found in such cases irrespective of the positive charge ratio of the lipoplex. Nevertheless, cytotoxicity and transfection assays would be necessary to confirm it.

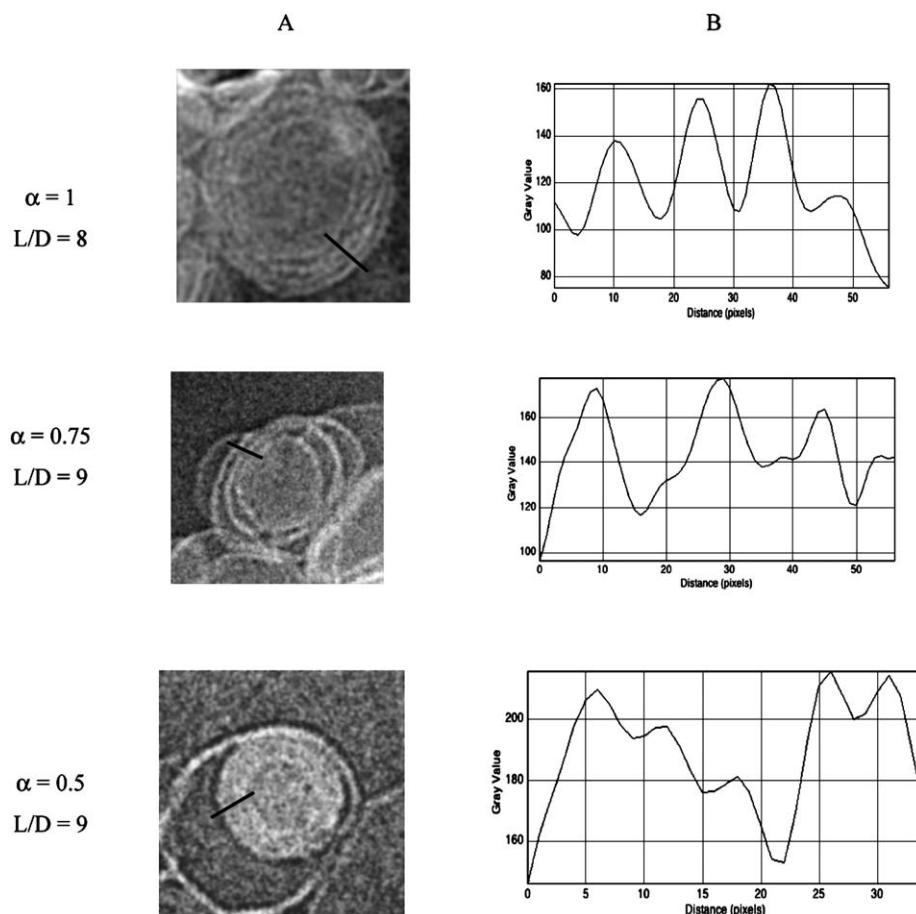
### Theoretical calculations

Fig. 13 shows the values for  $Q_{\text{ren}}$  as a function of  $Q$ , calculated by using the renormalization process described in the Theoretical background section of this work and the experimental conditions of the lipoplexes herein studied. As can be seen in the figure, results point out how  $Q$  increases linearly with  $Q_{\text{ren}}$  for low values of the bare charge (note that  $Q$  matches  $Q_{\text{ren}}$  only at very low  $Q$  values). In contrast,  $Q$  reaches a saturation regime for high values of  $Q$ . Under this situation, an increase in the bare charge of liposomes does not involve a proportional variation in their effective charge.

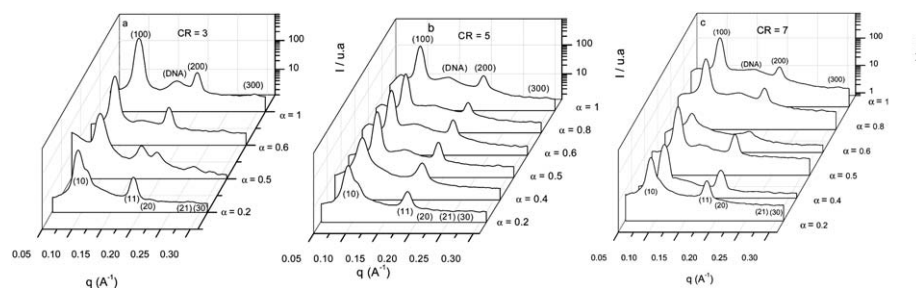
The effective surface charge has been evaluated from the measurement of electrochemical parameters of the lipid vesicles by Bordi *et al.*<sup>94</sup> In particular, these authors compared the effective charge with the structural one, derived from the full ionization of the surface charged groups. According to their results, a strong charge renormalization must be invoked to account for the electrochemical properties of liposomes. Following this approach, renormalization data from Fig. 13 have been used to analyze the electrophoretic mobility measurements of several lipoplex systems studied by our group, together with the complexation model of Sklovskii *et al.* According to this theory, the isoneutrality point can be theoretically predicted by means of eqn (2) and using the electrokinetic experiments. In particular, the values of  $S_a$  and  $S_d$ , obtained from electrophoresis measurements, are used as inputs in eqn (2) to calculate the phenomenological parameters  $S_0$  and  $E_0$ . Table 3 summarises the results obtained for the lipoplexes studied in this work, together with those obtained for other lipoplexes previously studied by our group.<sup>17</sup>

On the one hand, the values estimated for  $E_0$  are much higher than those obtained in previous cases for similar systems.<sup>16,17</sup> This is principally due to the definition of the electric capacitance used therein that did not include the effect of the ionic strength of the media. As a consequence, the salt-free values of  $C$  used to solve eqn (2) in our previous works were considerably low and less realistic than that proposed in the present work (see Theoretical background section). On the other hand, if  $S_0$  is directly identified with the isoneutrality liposome concentration (as the model suggests), the agreement with the experiments is quite good, as can be observed in Fig. 4, where  $S_0$  values, expressed in terms of  $(L/D)_\phi$ , are also included. Moreover, the theoretical values of  $S_0$  can be also used to estimate the charge of lipoplexes for  $L/D$  ratios around the isoneutrality point. To this end, eqn (1) is solved for each system. However, instead of the bare charges of





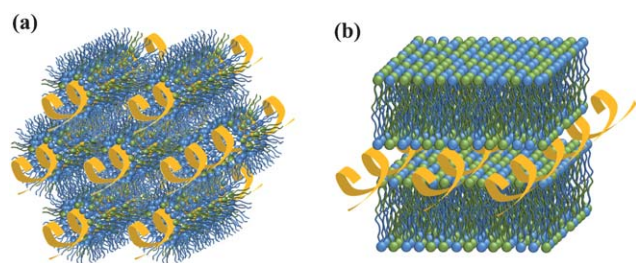
**Fig. 9** (A) A selected view of DOEPC/DOPE–DNA multilamellar lipoplexes as observed in the electron microscopy at different mixed liposome compositions ( $\alpha$ ). A solid black line was drawn perpendicular to the membranes to plot the variations in density, which appear as different grey levels in the TEM images. (B) Plot of grey levels along the line drawn in panel A as represented by ImageJ (Image processing and analysis in Java). The average distance between peaks, measured in pixels, was calculated and transformed in nm using the nm per pixel scale for each image: at  $\alpha = 1$ , 12.67 pixels (0.568 nm per pixel) = 7.2 nm; at  $\alpha = 0.75$ , 18.5 pixels (0.375 nm per pixel) = 6.9 nm; and at  $\alpha = 0.5$ , 6.25 pixels (1.075 nm per pixel) = 6.7 nm.



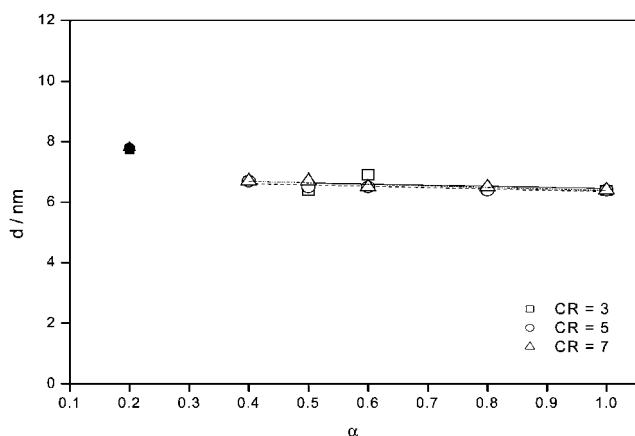
**Fig. 10** Diffractograms of DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes at different mixed lipid compositions ( $\alpha$ ) and a charge ratio CR = 3 (a), 5 (b) and 7 (c). DNA concentration was varied from 0.6 to 2.0  $\text{mg mL}^{-1}$  for CR = 3, from 0.38 to 1.48  $\text{mg mL}^{-1}$  for CR = 5 and from 0.26 to 1.09  $\text{mg mL}^{-1}$  for CR = 7. Total lipid concentration was varied from 15.5 to 20.3  $\text{mg mL}^{-1}$  for CR = 3, from 18.4 to 21.3  $\text{mg mL}^{-1}$  for CR = 5 and from 19.9 to 21.8  $\text{mg mL}^{-1}$  for CR = 7.

liposomes and DNA, the calculations have been done using the renormalization values according to the *jellium* model described in the Theoretical background section (see Fig. 13). Accordingly, by using the data shown in Table 3 and eqn (1),  $Q^*/Q_{\text{ren}}$  can be plotted as a function of the liposome concentration (Fig. 14). This figure clearly shows how the values  $S_0$  are always within the experimental range  $[S_a, S_d]$  and correspond to the liposome

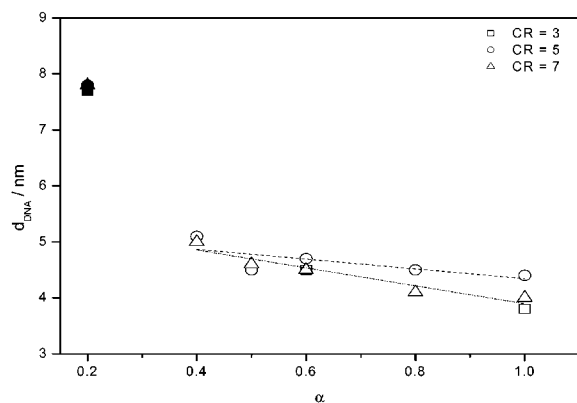
concentration at which  $Q^*/Q_{\text{ren}} = 0$ . In general, the results shown in Fig. 14 exhibit the behaviour predicted theoretically; in the cited range,  $Q^*/Q_{\text{ren}}$  varies according to eqn (1) and it tends to  $Z = \mp \sqrt{\frac{E_0 2C}{q_{\text{ren}} Q_{\text{ren}}}}$ , when  $S$  electrophoretic measurements in Fig. 1 is in very good agreement with the one presented by theoretical calculations in Fig. 14.



**Scheme 2** (a) Inverted hexagonal structure,  $H_{II}$ ; and (b) lamellar structure,  $L_{\alpha}$ .



**Fig. 11** Plots of the periodic distance of the lamellar structure ( $d$ ) as a function of  $\alpha$ , at charge ratios (CR) of 3 (squares), 5 (circles) and 7 (triangles). Open symbols:  $L_{\alpha}$  structure,  $\alpha \geq 0.4$ ; solid symbols:  $H_{II}$  structure,  $\alpha = 0.2$ .



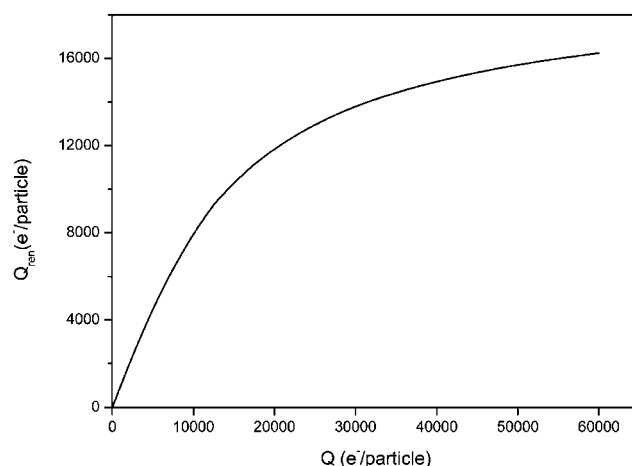
**Fig. 12** Plots of the distance between DNA helices ( $d_{DNA}$ ) as a function of  $\alpha$ , at charge ratios (CR) of 3 (squares), 5 (circles) and 7 (triangles). Open symbols:  $L_{\alpha}$  structure,  $\alpha \geq 0.4$ ; solid symbols:  $H_{II}$  structure,  $\alpha = 0.2$ .

Regarding the maximum magnitude of  $Q^*$ ,  $|Q^*|_{\max} = |Q_{\text{ren}}|$ , it generally increases with the charge of the liposomes (see Table 3). This feature confirms that the electrostatic interaction is the driving force in the formation of the complexes. However, the increase tends to be slower as the liposome charge is higher. This is a direct consequence of the

**Table 2** Values of interlayer distance ( $d$ ) and DNA strands separation within the monolayer ( $d_{DNA}$ ) at different  $L/D$  ratios and mixed liposome compositions ( $\alpha$ ) for DOEPC/DOPE–DNA lipoplexes at CR = 3, 5 and 7

| $\alpha$         | CR = 3.0      |                     |       | CR = 5.0      |                     |       | CR = 7.0      |                     |       |
|------------------|---------------|---------------------|-------|---------------|---------------------|-------|---------------|---------------------|-------|
|                  | $d/\text{nm}$ | $d_{DNA}/\text{nm}$ | $L/D$ | $d/\text{nm}$ | $d_{DNA}/\text{nm}$ | $L/D$ | $d/\text{nm}$ | $d_{DNA}/\text{nm}$ | $L/D$ |
| 1 <sup>a</sup>   | 6.4           | 3.8                 | 7.9   | 6.4           | 4.4                 | 12    | 6.4           | 4.0                 | 18    |
| 0.8 <sup>a</sup> | —             | —                   | 9.6   | 6.4           | 4.5                 | 15    | 6.5           | 4.1                 | 22    |
| 0.6 <sup>a</sup> | 6.9           | 4.5                 | 12    | 6.5           | 4.7                 | 20    | 6.5           | 4.5                 | 29    |
| 0.5 <sup>a</sup> | 6.4           | 3.8                 | 15    | 6.5           | 4.5                 | 23    | 6.7           | 4.6                 | 34    |
| 0.4 <sup>a</sup> | —             | —                   | 18    | 6.7           | 5.1                 | 29    | 6.7           | 5.0                 | 42    |
| 0.2 <sup>b</sup> | 7.7           | —                   | 35    | 7.8           | —                   | 56    | 7.8           | —                   | 82    |

<sup>a</sup> Lamellar  $L_{\alpha}$  structure. <sup>b</sup> Hexagonal  $H_{II}$  structure ( $d = d_{DNA}$ ).



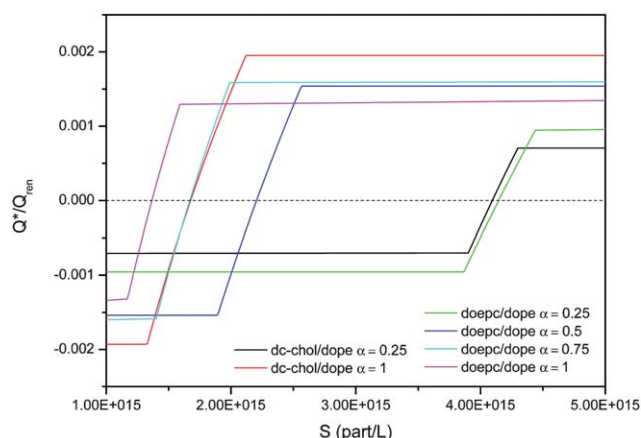
**Fig. 13** Renormalized charges ( $Q_{\text{ren}}$ ) provided by the *jellium* model (particle radius: 49.5 nm, volume fraction: 0.02, ionic strength: 160 mM and temperature: 298 K), as a function of the bare charge of liposomes ( $Q$ ).

renormalization process in which  $Q_{\text{ren}}$  tends to reach a saturation value as  $Q$  increases (see Fig. 13). In other words, although the charge of the liposomes favors the formation of liposome–DNA complexes and the increase of  $|Q^*|_{\max}$ , the model predicts that the number of DNA segments bound to each liposome, will reach a saturation value in such a way that it will not depend on the liposome charge. For instance, comparing the values  $|Q^*|_{\max}$  corresponding to DOEPC/DOPE–DNA at  $\alpha = 0.5$  and 1, they are very similar despite the fact that the bare charge of the latter is almost twice the bare charge of the former. This feature has been also observed in previous works<sup>17</sup> and implies that once the surface charge of liposomes is large enough, this is not the only parameter that favors the complexation of DNA with liposomes. In other words, the zwitterionic helper lipid plays also an important role in the formation of lipoplexes. Apart from that, the results also show the effect of the cationic lipid molar fraction ( $\alpha$ ) on the lipoplex charge is in a very good agreement with the experimental findings, *i.e.* the iso-neutrality is shifted towards lower experimental  $L/D$  values (see Fig. 1 or 4) and/or theoretical  $S$  values (see Fig. 14), as long as  $\alpha$  increases.

**Table 3** Renormalized charges provided by the *jellium* model ( $Q_{\text{ren}}$ ), phenomenological parameters of eqn (2) ( $S_0$  and  $E_0$ ) and maximal charge of lipoplexes ( $|Q^*|_{\text{max}}$ ) obtained from eqn (1), are shown for each lipoplex. Constant values of  $C = 2.78 \times 10^{-14} \text{ (C}^2 \text{ J}^{-1})$  and  $q_{\text{ren}} = 5.45 \times 10^{-18} \text{ C}$  were used for the calculations

| System  | $10^{15} Q_{\text{ren}}/\text{C}$ | $10^{-15} S_0/\text{part L}^{-1}$ | $10^{25} E_0/\text{J}$ | $10^{18}  Q^* _{\text{max}}/\text{C}$ |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| DC-CHOL/DOPE-DNA <sup>a</sup> $\alpha = 0.25$ | 1.45                              | 4.09                              | 0.71                   | 1.02                                  |
| DC-CHOL/DOPE-DNA <sup>a</sup> $\alpha = 1$    | 2.53                              | 1.68                              | 9.21                   | 5.02                                  |
| DOEPC/DOPE-DNA $\alpha = 0.25$                | 1.53                              | 4.15                              | 1.37                   | 1.53                                  |
| DOEPC/DOPE-DNA $\alpha = 0.5$                 | 2.07                              | 2.20                              | 4.83                   | 3.23                                  |
| DOEPC/DOPE-DNA $\alpha = 0.75$                | 2.33                              | 1.67                              | 5.81                   | 3.70                                  |
| DOEPC/DOPE-DNA $\alpha = 1$                   | 2.46                              | 1.37                              | 4.36                   | 3.25                                  |

<sup>a</sup> DC-CHOL is the acronym of the cationic lipid 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride.



**Fig. 14** Theoretical charge of lipoplexes calculated from eqn (1) and normalized by the renormalized charge ( $Q^*/Q_{\text{ren}}$ ) as a function of the liposome concentration ( $S$ ).

## Conclusions

A wide physicochemical study, consisting of both experimental (electrophoretic mobility, fluorescence spectroscopy, cryo-TEM and SAXS studies) and theoretical approaches, has evidenced that CT-DNA is properly condensed and compacted by DOEPC/DOPE cationic liposomes *via* a strong surface electrostatic interaction. DOEPC/DOPE liposomes are mainly spherical with a diameter of around  $(100 \pm 10) \text{ nm}$  and a lipidic bilayer of around  $(4.4 \pm 0.5) \text{ nm}$  thickness showing an appreciable percentage of multilamellar structures. Furthermore, cryo-TEM micrographs reveal that DOEPC/DOPE mixed liposomes may present a variety of looped, twisted and invaginated structures that are consistent with the fact that this mixed lipidic membrane shows a relatively high elasticity and, accordingly, increases the fusogenic capacity of the lipoplex. The periodicity of around  $7 \text{ nm}$  in the multilamellar structures of lipoplexes has been determined by digitizing and image processing techniques, indicating that DNA helixes are effectively sandwiched and aligned between cationic lipid bilayers. The isoneutrality of the lipoplex thus formed, determined by zeta potential, EtBr intercalation assays, and theoretical calculations decreases with the content of cationic lipid in the mixed liposome. This molar fraction has also a marked effect on lipoplex structures, which goes from inverted hexagonal phase,  $H_{\text{II}}$ , at low cationic lipid contents ( $\alpha \approx 0.2$ ) to lamellar phase,  $L_{\alpha}$ , at  $\alpha \geq 0.4$ . The experimental results are in very good agreement with the theoretical model used in this

work, reinforcing that a charge renormalization must be invoked to account for the electrochemical properties of liposomes and lipoplexes.

## Acknowledgements

The authors thank MICINN of Spain (Project Nos CTQ2009-10002BQU, SAF2008-00451, MAT2008-03232, MAT2009-13155-C04-04 and UCMA05-33-010), the CSIC (Project No. PIE200750-I021), the Comunidad Autónoma of Madrid (Project Nos S-SAL-0249-2006 and CAM S-BIO-0214-2006), the Junta de Andalucía (Project Nos P07-FQM-02517 and P09-FQM-4698), the “Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC)” from the “Instituto de Salud Carlos III” (RD06/0020/1001), the Human Frontiers Science Program (RGP39/2008), and the Universidad Complutense of Madrid (Project No. GR58-08). Authors also thank C. Aicart for carrying out gel agarose electrophoresis experiments at the Biochemistry and Molecular Biology Department of the UCM of Spain.

## References

- J. H. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 7413–7417.
- P. L. Felgner, M. J. Heller, J. M. Lehn, J.-P. Behr and F. C. Szoka, *Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery*, American Chemical Society, Washington, DC, 1996.
- R. I. Mahato and S. W. Kim, *Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid–Base Therapeutics*, Taylor and Francis, London, 2002.
- D. D. Lasic, *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997.
- K. Ewert, N. L. Slack, A. Ahmad, H. M. Evans, A. J. Lin, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *Curr. Med. Chem.*, 2004, **11**, 133–149.
- C. Loney, M. Vandenbranden and J. M. Ruyschaert, *Prog. Lipid Res.*, 2008, **47**, 340–347.
- B. C. Ma, S. B. Zhang, H. M. Jiang, B. D. Zhao and H. T. Lv, *J. Controlled Release*, 2007, **123**, 184–194.
- C. R. Safinya, K. Ewert, A. Ahmad, H. M. Evans, U. Raviv, D. J. Needleman, A. J. Lin, N. L. Slack, C. George and C. E. Samuel, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A*, 2006, **364**, 2573–2596.
- A. Bajaj, P. Kondaiah and S. Bhattacharya, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 1537–1546.
- A. Bajaj, P. Kondaiah and S. Bhattacharya, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 991–999.
- R. S. Dias and B. Lindman, *DNA Interaction with Polymers and Surfactants*, Wiley & Sons, Hoboken, 2008.
- G. Caracciolo and R. Caminiti, *Chem. Phys. Lett.*, 2005, **411**, 327–332.

- 13 G. Caracciolo, D. Pozzi, H. Amenitsch and R. Caminiti, *Langmuir*, 2005, **21**, 11582–11587.
- 14 L. Ciani, A. Casini, C. Gabbiani, S. Ristori, L. Messori and G. Martini, *Biophys. Chem.*, 2007, **127**, 213–220.
- 15 A. Rodriguez-Pulido, E. Aicart, O. Llorca and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 2187–2197.
- 16 A. Rodriguez-Pulido, A. Martin-Molina, C. Rodriguez-Beas, O. Llorca, E. Aicart and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 15648–15661.
- 17 M. Muñoz-Ubeda, A. Rodriguez-Pulido, A. Nogales, A. Martin-Molina, E. Aicart and E. Junquera, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 3332–3340.
- 18 C. J. Wheeler, P. L. Felgner, Y. J. Tsai, J. Marshall, L. Sukhu, S. G. Doh, J. Hartikka, J. Nietupski, M. Mabthorpe, M. Nichols, M. Plewe, X. Liang, J. Norman, A. Smith and S. H. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 11454.
- 19 J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt and C. R. Safinya, *Science*, 1997, **275**, 810–814.
- 20 I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler and C. R. Safinya, *Science*, 1998, **281**, 78–81.
- 21 D. Uhríkova, I. Zajac, M. Dubnickova, M. Pisarcik, S. S. Funari, G. Rapp and P. Balgavy, *Colloids Surf., B*, 2005, **42**, 59–68.
- 22 A. J. Kirby, P. Camilleri, J. Engberts, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, O. Soderman, M. Bergsma, P. C. Bell, M. L. Fielden, C. L. G. Rodriguez, P. Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin and M. C. P. van Eijk, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1448–1457.
- 23 P. C. Bell, M. Bergsma, I. P. Dolbnya, W. Bras, M. C. A. Stuart, A. E. Rowan, M. C. Feiters and J. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1551–1558.
- 24 X. F. Zhao, Y. Z. Shang, H. L. Liu and Y. Hu, *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **314**, 478–483.
- 25 P. Luciani, C. Bombelli, M. Colone, L. Giansanti, S. J. Ryhanen, V. M. J. Saily, G. Mancini and P. K. J. Kinnunen, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1999–2003.
- 26 A. Bajaj, P. Kondiah and S. Bhattacharya, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 2432–2442.
- 27 C. Bombelli, S. Borocci, M. Diociaiuti, F. Faggioli, L. Galantini, P. Luciani, G. Mancini and M. G. Sacco, *Langmuir*, 2005, **21**, 10271–10274.
- 28 A. Ahmad, H. M. Evans, K. Ewert, C. X. George, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *J. Gene Med.*, 2005, **7**, 739–748.
- 29 K. K. Ewert, H. M. Evans, A. Zidovska, N. F. Boussein, A. Ahmad and C. R. Safinya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3998–4006.
- 30 K. K. Ewert, H. M. Evans, N. F. Boussein and C. R. Safinya, *Bioconjugate Chem.*, 2006, **17**, 877–888.
- 31 Y. Obata, D. Suzuki and S. Takeoka, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1055–1063.
- 32 A. J. Lin, N. L. Slack, A. Ahmad, C. X. George, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *Biophys. J.*, 2003, **84**, 3307–3316.
- 33 D. D. Lasic, H. Strey, M. A. C. Stuart and P. R. Frederik, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 832–833.
- 34 P. C. A. Barreleiro, G. Olofsson, W. Brown, K. Edwards, N. M. Bonassi and E. Feitosa, *Langmuir*, 2002, **18**, 1024–1029.
- 35 E. Feitosa, F. R. Alves, A. Niemiec, M. Oliveira, E. M. S. Castanheira and A. L. F. Baptista, *Langmuir*, 2006, **22**, 3579–3585.
- 36 A. Salvati, L. Ciani, S. Ristori, G. Martini, A. Masi and A. Arcangeli, *Biophys. Chem.*, 2006, **121**, 21–29.
- 37 J. Gustafsson, G. Arvidson, G. Karlsson and M. Almgren, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1995, **1235**, 305–312.
- 38 Y. H. Xu, S. W. Hui, P. Frederik and F. C. Szoka, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 341–353.
- 39 D. Hirsch-Lerner, M. Zhang, H. Eliyahu, M. E. Ferrari, C. J. Wheeler and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2005, **1714**, 71–84.
- 40 N. J. Zuidam and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1998, **1368**, 115–128.
- 41 K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg and B. Lindman, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, J. Wiley & Sons, Chichester, England, 2003.
- 42 L. Moreau, P. Barthelemy, Y. G. Li, D. Luo, C. A. H. Prata and M. W. Grinstaff, *Mol. Biosyst.*, 2005, **1**, 260–264.
- 43 A. S. Janoff, *Liposomes: Rational Design*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- 44 M. Rosoff, *Vesicles*, Marcel Dekker, New York, 1996.
- 45 J. O. Rädler, I. Koltover, A. Jamieson, T. Salditt and C. R. Safinya, *Langmuir*, 1998, **14**, 4272–4283.
- 46 J. C. Birchall, I. W. Kellaway and S. N. Mills, *Int. J. Pharm.*, 1999, **183**, 195–207.
- 47 B. C. Lobo, S. A. Rogers, S. Choosakoonkriang, J. G. Smith, G. S. Koe and C. R. Middaugh, *J. Pharm. Sci.*, 2001, **91**, 454–466.
- 48 S. J. Eastman, C. Siegel, J. Tousignant, A. E. Smith, S. H. Cheng and R. K. Scheule, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1997, **1325**, 41–62.
- 49 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Acad./Plenum, New York, 1999.
- 50 R. C. MacDonald, G. W. Ashley, M. M. Shida, V. A. Rakhmanova, Y. S. Tarahovsky, D. P. Pantazatos, M. T. Kennedy, E. V. Pozharski, K. A. Baker, R. D. Jones, H. S. Rosenzweig, K. L. Choi, R. Qiu and T. J. McIntosh, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 2612–2629.
- 51 Y. S. Tarahovsky, R. Koynova and R. C. MacDonald, *Biophys. J.*, 2004, **87**, 1054–1064.
- 52 S. Bhattacharya and S. S. Mandal, *Biochemistry*, 1998, **37**, 7764–7777.
- 53 A. J. Geall, M. A. W. Eaton, T. Baker, C. Catterall and I. S. Blagbrough, *FEBS Lett.*, 1999, **459**, 337–342.
- 54 V. Borenstain and Y. Barenholz, *Chem. Phys. Lipids*, 1993, **64**, 117–127.
- 55 D. Hirsch-Lerner and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1998, **1370**, 17–30.
- 56 B. R. Lentz, B. M. Moore and D. A. Barrow, *Biophys. J.*, 1979, **25**, 489–494.
- 57 A. E. Regelin, S. Fankhaenel, L. Gurtesch, C. Prinz, G. von Kiedrowski and U. Massing, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2000, **1464**, 151–164.
- 58 S. J. Ryhänen, M. J. Säily, T. Paukku, S. Borocci, G. Mancini, J. M. Holopainen and P. K. Kinnunen, *Biophys. J.*, 2003, **84**, 578–587.
- 59 V. Alfredsson, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2005, **10**, 269–273.
- 60 R. S. Dias, B. Lindman and M. G. Miguel, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 12600–12607.
- 61 S. Huebner, B. J. Battersby, R. Grimm and G. Cevc, *Biophys. J.*, 1999, **76**, 3158–3166.
- 62 Y. S. Mel'nikova, S. M. Mel'nikov and J. E. Lofroth, *Biophys. Chem.*, 1999, **81**, 125–141.
- 63 M. Scarzello, V. Chupin, A. Wagenaar, M. C. A. Stuart, J. B. F. N. Engberts and R. Hulst, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 2104–2113.
- 64 M. Silvander and K. Edwards, *Anal. Biochem.*, 1996, **242**, 40–44.
- 65 J. Smisterova, A. Wagenaar, M. C. A. Stuart, E. Polushkin, G. Brinke, R. Hulst, J. B. F. N. Engberts and D. Hoekstra, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 47615–47622.
- 66 T. T. Nguyen and B. I. Shklovskii, *J. Chem. Phys.*, 2001, **114**, 5905–5916.
- 67 T. T. Nguyen and B. I. Shklovskii, *J. Chem. Phys.*, 2001, **115**, 7298–7308.
- 68 S. Sennato, F. Bordini and C. Cametti, *J. Chem. Phys.*, 2004, **121**, 4936–4940.
- 69 P. C. A. Barreleiro and B. Lindman, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 6208–6213.
- 70 S. M. Mel'nikov and B. Lindman, *Langmuir*, 1999, **15**, 1923–1928.
- 71 E. Gonçalves, R. J. Debs and T. D. Heath, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 1554–1563.
- 72 E. Junquera, L. Peña and E. Aicart, *Langmuir*, 1997, **13**, 219–224.
- 73 E. Junquera, P. del Burgo, J. Boskovic and E. Aicart, *Langmuir*, 2005, **21**, 7143–7152.
- 74 E. Junquera and E. Aicart, *Int. J. Pharm.*, 1999, **176**, 169–178.
- 75 C. Merino, E. Junquera, J. Jimenez-Barbero and E. Aicart, *Langmuir*, 2000, **16**, 1557–1565.
- 76 W. D. Tian and Y. Q. Ma, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 13161–13170.
- 77 N. K. Voulgarakis, K. O. Rasmussen and P. M. Welch, *J. Chem. Phys.*, 2009, **130**, 155101.
- 78 M. Deserno, F. Jimenez-Angeles, C. Holm and M. Lozada-Cassou, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 10983–10991.
- 79 P. Chodanowski and S. Stoll, *Macromolecules*, 2001, **34**, 2320–2328.
- 80 C. Haro-Perez, M. Quesada-Fernandez, J. Callejas-Fernandez, E. Sabate, J. Estelrich and R. Hidalgo-Alvarez, *Colloids Surf., A*, 2005, **270**, 352–356.
- 81 C. Haro-Perez, M. Quesada-Perez, J. Callejas-Fernandez, P. Shurtenberger and R. Hidalgo-Alvarez, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2006, **18**, L363–L369.
- 82 A. V. Delgado, *Interfacial Electrokinesics and Electrophoresis*, Marcel Dekker, New York, 2002.
- 83 H. Ohshima and K. Furusawa, *Electrical Phenomena at Interfaces. Fundamentals, Measurements, and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1998.



- 84 A. Congiu, D. Pozzi, C. Esposito, C. Castellano and G. Mossa, *Colloids Surf., B*, 2004, **36**, 43–48.
- 85 C. Esposito, J. Generosi, G. Mossa, A. Masotti and A. C. Castellano, *Colloids Surf., B*, 2006, **53**, 187–192.
- 86 H. Farhood, N. Serbina and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1995, **1235**, 289–295.
- 87 Y. S. Tarahovsky, V. A. Rakhmanova, R. M. Epand and R. C. MacDonald, *Biophys. J.*, 2002, **82**, 264–273.
- 88 N. J. Caplen, E. W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffrey and M. E. Hodson, *Nat. Med.*, 1995, **1**, 39–46.
- 89 J. N. Phillips, *Trans. Faraday Soc.*, 1955, **51**, 561–569.
- 90 A. Rodriguez-Pulido, F. Ortega, O. Llorca, E. Aicart and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 12555–12565.
- 91 I. Koltover, T. Salditt and C. R. Safinya, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 915–924.
- 92 D. Pozzi, G. Caracciolo, R. Caminiti, S. C. De Sanctis, H. Amenitsch, C. Marchini, M. Montani and A. Amici, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2009, **1**, 2237–2249.
- 93 N. F. Boussein, C. S. McAllister, K. K. Ewert, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *Biochemistry*, 2007, **46**, 4785–4792.
- 94 F. Bordi, C. Cametti, S. Sennato, B. Paoli and C. Marianecci, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 4808–4814.

### 3.1.2. DISCUSIÓN

En este apartado se ha realizado una discusión integradora de los resultados presentados en los Artículos 1 y 2 del apartado anterior y para ello se han hecho uso de las Figuras y Tablas que aparecen en las citadas publicaciones. Los lipoplejos de los dos sistemas estudiados en este apartado, DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA, han sido caracterizados desde un punto de vista biofísico mediante diversas técnicas experimentales y herramientas teóricas que han dado lugar a un análisis electroquímico, espectroscópico, microscópico/estructural y de estabilidad.

Uno de los aspectos más importantes en el proceso de formación de los lipoplejos es analizar y comprender la **interacción entre el liposoma mixto y el DNA**, y para ello la caracterización electroquímica de los lipoplejos constituye el punto de arranque sobre el que se asienta el conjunto de estudios, no solo los biofísicos, sino también, cuando se vayan a realizar, los estudios bioquímicos. Ello se debe a que en la formación del lipoplejo se produce un balance entre las cargas positivas del lípido catiónico y las negativas del DNA, y por ello, las propiedades electroquímicas, como la movilidad electroforética y las propiedades que de ella derivan, el potencial zeta,  $\zeta$ , o la densidad de carga superficial,  $\sigma_s$ , son las que pueden aportar la información más completa del citado proceso. Muchas de las propiedades de los lipoplejos cambian en el punto de electroneutralidad (donde  $CR = 1$  y en el que se puede determinar la relación  $(L/D)_\phi$ ), a partir del cuál el lipoplejo presenta carga neta positiva, requisito indispensable para que se produzca transfección en las células, puesto que la membrana celular está cargada negativamente. Las medidas de potencial zeta en función de  $L/D$ , ajustadas a una curva sigmoideal (Figura 1 del Art.1 y Art. 2 y Tabla 1 del Art. 2), han permitido obtener el valor de  $(L/D)_\phi$  para cada una de las fracciones molares del lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , estudiadas, a partir de la inversión de signo del potencial zeta a un valor  $L/D$  específico. Esta inversión de potencial revela que la interacción liposoma mixto-ctDNA ocurre de manera superficial y electrostática, formándose lipoplejos estables. Por otro lado, está bien documentado que este proceso de compactación está dirigido entrópicamente debido a la liberación de contraiones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  del liposoma catiónico mixto y del biopolímero.<sup>2</sup> Los valores de  $(L/D)_\phi$  obtenidos para ambos sistemas, DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA, en función de  $\alpha$ , indican que para una concentración de ctDNA dada, a medida que la fracción molar de lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , aumenta, la electroneutralidad es alcanzada a menor valor  $L/D$ , comportamiento esperado ya que en el valor de  $L$  ( $= L^+ +$

$L^0$ ) está implicada también la masa del lípido zwitteriónico que forma parte del liposoma mixto (Figura 1 del Art.1 y Art. 2). El DC-Chol y el DOEPC poseen cabezas catiónicas distintas y sus regiones apolares, aunque de longitud parecida, son bastante diferentes en composición y geometría (Esquema 1 del Art. 1 y del Art. 2). Sin embargo, a un determinado valor de  $\alpha$ , se han obtenido valores de electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , bastante similares para los dos lipoplejos estudiados, lo que indica que el tipo y grado de interacción liposoma mixto-DNA es bastante similar en los dos lipoplejos.

La determinación experimental del valor de la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , a distinta fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , se ha realizado también a partir del estudio de espectroscopia de fluorescencia con intercalación de Bromuro de Etidio (EtBr). El estudio se ha llevado a cabo sólo para el lipoplejo DOEPC/DOPE-ctDNA, puesto que el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA ya fue abordado en un trabajo previo a esta Tesis Doctoral.<sup>1</sup> El experimento se basa en que el EtBr, que es un fluoróforo catiónico con una estructura aromática plana que apenas fluoresce en disolución acuosa, cuando se encuentra intercalado entre los pares de bases del DNA, que le proporcionan un entorno hifrofóbico protector, tiene una elevada intensidad de emisión de fluorescencia, la cuál va disminuyendo a medida que se va adicionando liposoma mixto. Ello implica que existe una competencia entre el liposoma y la sonda fluorescente por el biopolímero; cuando el liposoma catiónico interacciona con el biopolímero superficial y electrostáticamente, provoca la expulsión de la sonda EtBr de la doble hélice del DNA hacia el medio acuoso (Figura 2 del Art. 2), donde los procesos de desactivación bimolecular por parte de las moléculas de agua y oxígeno hacen disminuir el rendimiento cuántico de fluorescencia de la sonda, y, por tanto, la intensidad de emisión fluorescente. Se puede concluir, por tanto, que la interacción DNA-liposoma mixto es más fuerte que la interacción EtBr-DNA. Asimismo, la Figura 2 del Art. 2 pone en evidencia que no existe interacción entre el liposoma mixto y la sonda, habida cuenta de que el espectro de emisión de la sonda en medio acuoso tamponado (blancos) coincide, dentro del error experimental, con el de la sonda en presencia sólo de liposoma mixto (ver espectros correspondientes a las líneas de puntos y discontinua, respectivamente). Con esta técnica de fluorescencia se han realizado dos análisis complementarios: a) se han obtenido los valores de  $(L/D)_\phi$  a distinta fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , (Figura 3 del Art. 2), estando los valores obtenidos en muy buena concordancia con los determinados a partir del potencial zeta; y b) se han deconvolucionado las bandas  $\pi-\pi^*$  experimentales en un número adecuado de bandas

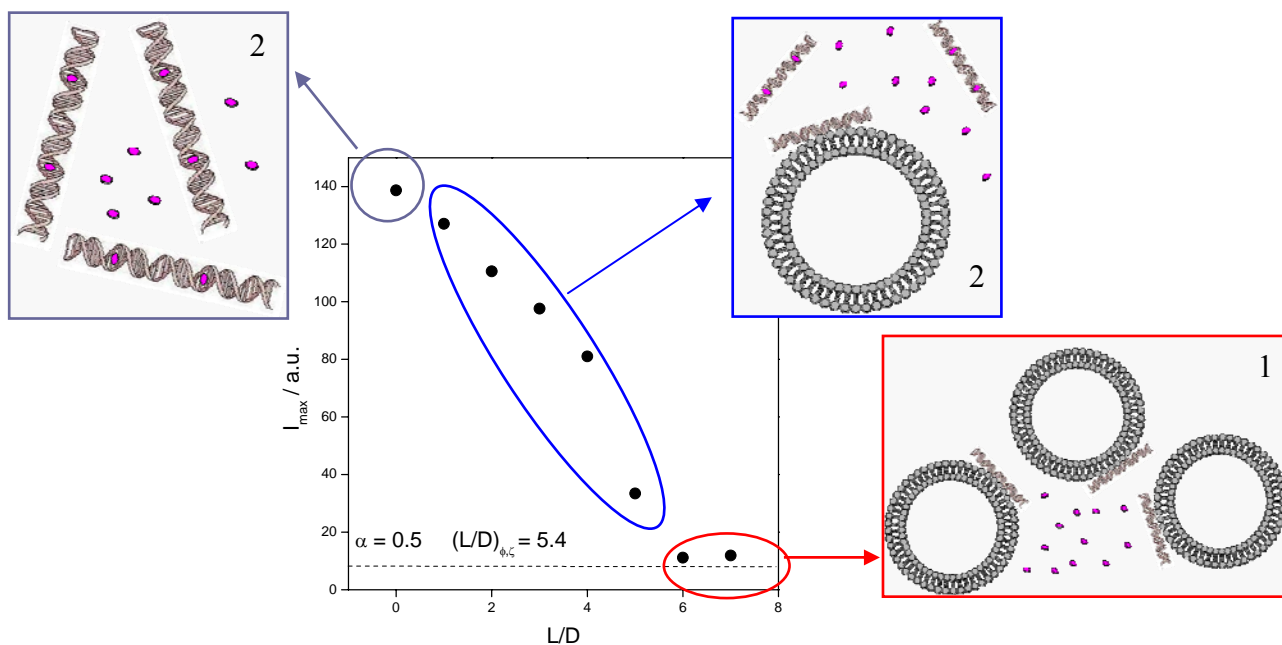
gaussianas mediante un ajuste no lineal múltiplos, siguiendo un procedimiento propuesto por nuestro grupo y detallado en trabajos previos.<sup>3</sup> Cada una de las bandas resultantes, ha sido asignada a la emisión  $\pi-\pi^*$  de la sonda ubicada en distintos microentornos, los cuales están caracterizados por su hidrofobicidad, microviscosidad, rigidez y/o solvatación. La elección del número de sub-bandas adecuado se basa en los datos fotofísicos de emisión de la sonda y en un buen acuerdo entre la segunda derivada del espectro experimental y del espectro envolvente suma de las componentes gaussianas. La figura 5 del Art. 2 muestra, a modo de ejemplo, el proceso de deconvoluciones en 1 y 2 bandas gaussianas de los espectros de emisión de fluorescencia de los lipoplejos DOEPC/DOPE-ctDNA a  $\alpha = 0,5$ , a algunas de las relaciones  $L/D$  estudiadas, cuyos parámetros espectroscópicos están recogidos en la tabla 3.1. Para el resto de fracciones molares, se ha procedido de la misma forma.

| <i>L/D</i> | <i>I<sub>588</sub></i> | <i>DECONVOLUCIÓN EN<br/>2 GAUSSIANS</i> |                      |                             |                            |                      |                             |   | <i>DECONVOLUCIÓN EN<br/>1 GAUSSIANA</i> |                      |                      |   |
|------------|------------------------|---|----------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|---|---|----------------------|----------------------|---|
|            |                        | $\lambda_1 /$<br><i>nm</i>              | <i>W<sub>1</sub></i> | <i>A<sub>1</sub></i><br>(%) | $\lambda_2 /$<br><i>nm</i> | <i>W<sub>2</sub></i> | <i>A<sub>2</sub></i><br>(%) | <i>r<sup>2</sup>(<math>\chi^2</math>)</i> | $\lambda_1 /$ <i>nm</i>                 | <i>W<sub>1</sub></i> | <i>A<sub>1</sub></i> | <i>r<sup>2</sup>(<math>\chi^2</math>)</i> |
| 0          | 139                    | 580                                     | 34                   | 2676<br>(34)                | 601                        | 49                   | 5308<br>(67)                | 0,9996<br>(0,86)                          |   |                      |                      |   |
| 1,0        | 127                    | 580                                     | 33                   | 1895<br>(26)                | 598                        | 50                   | 5496<br>(74)                | 0,9996<br>(0,80)                          |   |                      |                      |   |
| 2,0        | 111                    | 580                                     | 33                   | 1532<br>(24)                | 597                        | 51                   | 4911<br>(76)                | 0,9995<br>(0,70)                          |   |                      |                      |   |
| 3,0        | 98                     | 580                                     | 31                   | 1009<br>(18)                | 596                        | 51                   | 4606<br>(82)                | 0,9993<br>(0,77)                          |   |                      |                      |   |
| 4,0        | 81                     | 583                                     | 30                   | 874<br>(19)                 | 596                        | 53                   | 3684<br>(81)                | 0,9994<br>(0,41)                          |   |                      |                      |   |
| 5,0        | 33                     | 581                                     | 29                   | 232<br>(13)                 | 596                        | 52                   | 1601<br>(87)                | 0,9990<br>(0,11)                          |   |                      |                      |   |
| 6,0        | 11                     |   |                      |                             |                            |                      |                             |   | 593                                     | 49                   | 582                  | 0,996<br>(0,1)                            |
| 7,0        | 12                     |   |                      |                             |                            |                      |                             |   | 591                                     | 51                   | 635                  | 0,992<br>(0,1)                            |

**Tabla 3.1.** Parámetros de las componentes gaussianas procedentes de la deconvolución de la emisión de fluorescencia de EtBr en presencia de lipoplejos de DOEPC/DOPE-ctDNA  $\alpha = 0,5$ , a distintas relaciones  $L/D$ . Relación DOEPC:DOPE, 1:1; relación DNA:EtBr, 6:1; [DNA] = 0,025 mg/mL;  $\lambda_b$ , longitud de onda;  $W_b$ , anchura de la banda;  $A_b$ , área; %, contribución al área total de la banda de fluorescencia (entre paréntesis).



Los datos de la tabla, así como la Figura 5 del Art. 2 muestran cómo a  $L/D < (L/D)_\phi$  la curva se ajusta a dos gaussianas correspondientes a  $\lambda_1 = (580 \pm 5) \text{ nm}$  y  $\lambda_2 = (600 \pm 5) \text{ nm}$ , lo que significa que la sonda se encuentra en dos medios distintos. La banda de mayor longitud de onda, debe identificarse con la emisión  $\pi \rightarrow \pi^*$  del EtBr localizado en el seno de la disolución, dada la similitud entre esta longitud de onda de emisión y la encontrada en los blancos,  $\lambda = (594 \pm 3) \text{ nm}$ . Por otro lado, la banda de menor longitud de onda (desplazada al azul) se asigna a la emisión cuando la sonda se localiza en el microentorno más hidrofóbico que el seno de la disolución, es decir, intercalado entre los pares de bases de la doble hélice del DNA. En cambio, para  $(L/D > (L/D)_\phi)$  el ajuste converge mejor a una sola banda gaussiana centrada en  $\lambda = (592 \pm 5) \text{ nm}$ , que, por tanto, se asigna a la sonda inmersa en el seno de la disolución. Esta evidencia corrobora que, efectivamente, tal y como se comentó previamente, el EtBr inicialmente intercalado en la doble hélice de DNA (2 microentornos), es desplazado al seno de la disolución (1 microentorno) al adicionar liposoma y formarse el lipoplejo de DOEPC/DOPE-ctDNA, como puede verse resumido y esquematizado en la Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Intensidad de emisión de fluorescencia de EtBr a 588 nm en presencia de lipoplejos de DOEPC/DOPE-ctDNA en función de la relación  $L/D$ , para  $\alpha = 0,5$ . Medio: PBS 160 mM,  $\text{pH} = 7,5$ . Relación DNA:EtBr = 6:1.  $[DNA] = 0,025 \text{ mg/mL}$ . Los dibujos muestran esquemas de los microentornos donde se aloja la sonda a diferentes  $L/D$ , y los números indican el número óptimo de componentes gaussianas y, por tanto, el número de microentornos posibles en cada caso. La línea discontinua muestra la emisión fluorescente del EtBr en presencia sólo de liposomas.

Por otra parte, en la Figura 6 del Art. 2 se ha representado el área de las gaussianas en función de  $L/D$  a todas las  $\alpha$  estudiadas, y se observa como  $A_1$ , relacionada con la intensidad de la sonda en el interior de la doble hélice del DNA, disminuye mientras que  $A_2$ , relacionada con la intensidad de la sonda en el medio acuoso, aumenta con  $L/D$  confirmando que el contenido de EtBr disminuye dentro de la hélice de DNA y aumenta en el medio acuoso a medida que se va formando el lipoplejo. El estudio de intercalación con EtBr ha confirmado la fuerte interacción electrostática entre el liposoma mixto y el DNA, mayor que la interacción EtBr-DNA, de modo que cuando se forma el lipoplejo, el EtBr es expulsado de su ubicación inicial, entre las dobles hélices del DNA, y es desplazado al medio acuoso. Por último, cabe señalar que, comparando las intensidades de fluorescencia vs  $L/D$  para los dos sistemas DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA (Figura 4 de la ref.<sup>1</sup> y Figura 3 del Art. 2) se puede concluir que el tipo y/o grado de interacción liposoma mixto-DNA es similar en ambos lipoplejos, lo que corrobora la misma conclusión a la que se ha llegado a partir de las medidas de potencial zeta.

Por otro lado, la fluidez de la membrana lipídica es un parámetro biofísico estrechamente relacionado con la estabilidad de los liposomas y lipoplejos,<sup>4</sup> y por tanto con la eficiencia de la transfección del DNA cuando se usan vectores coloidales. La anisotropía de fluorescencia,  $r$ , de una sonda, como por ejemplo el DPH utilizado en este estudio, es una propiedad directamente relacionada con la fluidez del medio en el que está ubicada. Así, a medida que una membrana se hace más fluida, y por tanto el grado de rotación de un fluoróforo excitado localizado en su interior aumenta, la anisotropía disminuye. En la Figura 7 del Art.1, donde se recogen los valores de la anisotropía de fluorescencia,  $r$ , para el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA, se puede observar que la anisotropía disminuye, y por tanto la fluidez de la bicapa lipídica aumenta al elevar la temperatura. Además, tanto en el liposoma mixto como en el lipoplejo, la presencia de DOPE, que es un lípido fusogénico con las membranas celulares, provoca una disminución de la anisotropía,  $r$  (y por tanto un aumento de la fluidez del agregado) de alrededor del 30 % a medida que disminuye el valor de  $\alpha$  en el lipoplejo. En cualquier caso, y de acuerdo con los resultados previos obtenidos para otros lipoplejos<sup>4</sup> indican que valores de anisotropía menores de 0,20-0,25 se corresponden con estructuras suficientemente fluidas como para ser potencialmente eficientes en el proceso de transfección celular. Por ello, del estudio de anisotropía de fluorescencia realizado en este apartado se puede concluir que los lipoplejos DC-Chol/DOPE-ctDNA son potencialmente válidos como agentes de transfección del DNA, a

la temperatura fisiológica, en todo el intervalo de fracción molar de CL en el liposoma mixto, y tanto mejores a fracción molar moderadas o bajas del lípido catiónico. A partir de los valores de  $r$ , de dicha Figura 7, se confirma que la temperatura de transición de fase gel-fluido,  $T_m$ , de la bicapa lipídica en ausencia y en presencia de DNA, está por debajo de la temperatura ambiente y de la temperatura fisiológica del cuerpo humano. Esta temperatura,  $T_m$ , es otro parámetro importante para estimar la fluidez de la membrana, ya que cuanto menor sea  $T_m$ , más fluida será la membrana (Figura 7 del Art. 1) y potencialmente más efectiva será la liberación del DNA del lipoplejo en el proceso de transfección celular.

**La estructura, el tamaño y la morfología de los lipoplejos** tienen una influencia decisiva en el grado de eficiencia en la transfección del DNA a las células vivas.<sup>5</sup> La determinación experimental de estas propiedades se ha realizado a partir de la crio-microscopia electrónica de transmisión (crio-TEM) y la dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS). El equipo ZetaPALS, utilizado en las medidas de potencial zeta, también ha permitido determinar el tamaño de partícula de los liposomas mixtos.

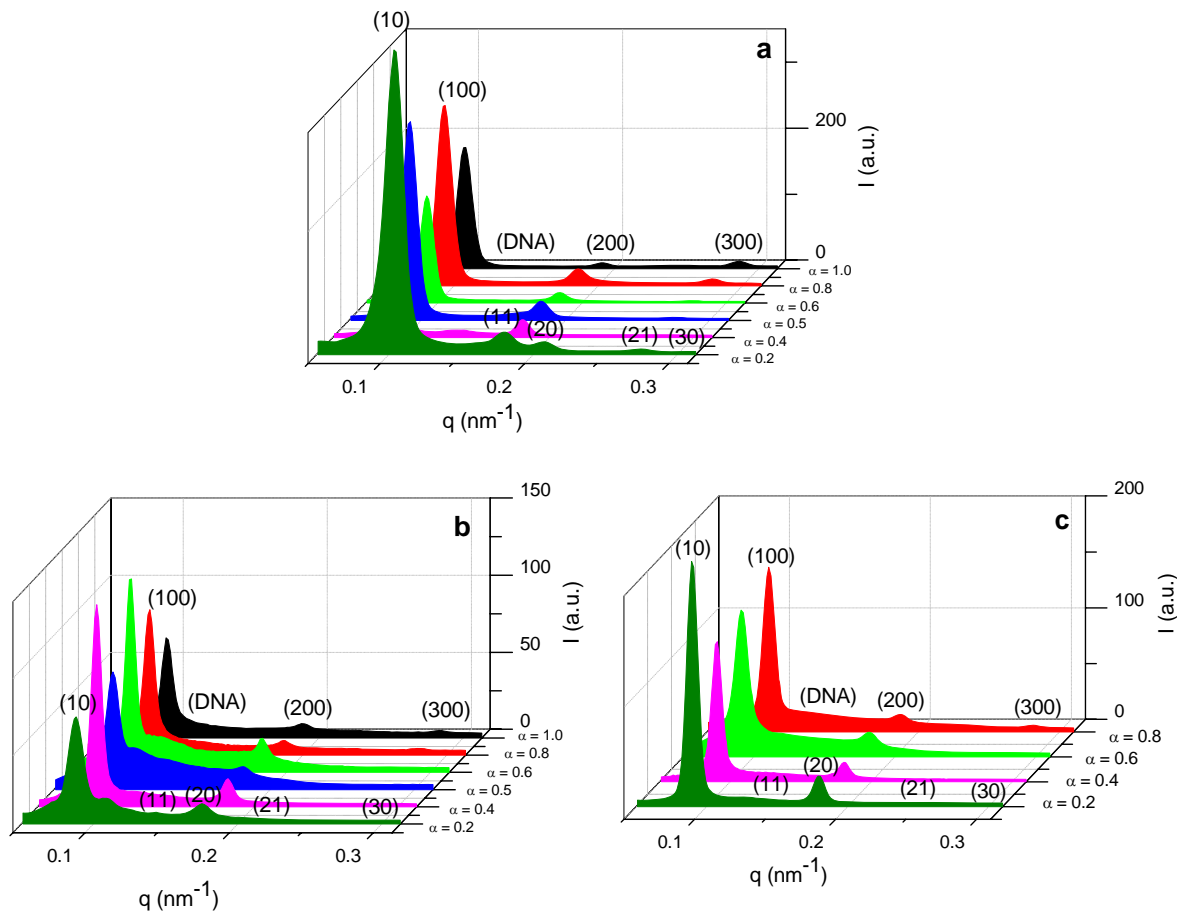
El estudio de microscopía electrónica mediante crio-TEM del DOEPC/DOPE-ctDNA se realizó a diferentes valores de fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y a valores de  $L/D > (L/D)_\phi$ , para asegurar una carga neta positiva en el lipoplejo. Las micrografías de crio-TEM (Figura 7 del Art. 2) revelan que, en ausencia de DNA, los liposomas mixtos DOEPC/DOPE, en su mayoría, son esféricos con un diámetro medio de  $(100 \pm 10) \text{ nm}$  y un espesor de bicapa de  $(4,4 \pm 0,5) \text{ nm}$ , lo que está en buen acuerdo con el diámetro hidrodinámico promedio de partícula,  $(108 \pm 10) \text{ nm}$ , obtenido a partir del equipo ZetaPALS para este liposoma mixto a varias fracciones molares de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ . Sin embargo, en presencia de DNA, es decir cuando se ha formado el lipoplejo DOEPC/DOPE-ctDNA (Figura 8 del Art. 2), las micrografías muestran un elevado porcentaje de estructuras multilamelares, es decir, un engrosamiento del espesor de las bicapas de los liposomas mixtos al formarse los agregados multilamelares. Estas estructuras multilamelares están constituidas por un conjunto de bicapas lipídicas con DNA compactado superficialmente entre ellas formando una monocapa (Figura 8 y Esquema 2 del Art. 2). También se observan algunas estructuras invaginadas, enrolladas en bucle y retorcidas, lo que indica una elevada flexibilidad de las bicapas lipídicas de estos liposomas mixtos y lipoplejos (Figura 8 del Art. 2). Estas estructuras son consistentes con las estructuras del DOEPC y DOPE, que poseen una insaturación olefínica en

configuración *cis* en la posición 9 en las dos cadenas hidrocarbonadas (Esquema 1 del Art. 2). La presencia de este doble enlace es el responsable del bajo valor de  $T_m$  que presentan ambos lípidos, lo que refuerza el carácter fusogénico de este liposoma mixto.

La formación de los lipoplejos ha inducido un cambio en la morfología de los liposomas, debido a que los lipoplejos son estructuras más condensadas. Además, estos lipoplejos presentan una acumulación de densidad electrónica en su superficie y pierden nitidez en la bicapa lipídica. Esta característica indica que el DNA está compactado en la superficie de los liposomas por medio de una fuerte interacción electrostática y superficial asimétrica, dato corroborado por los resultados de potencial zeta y espectroscopia de fluorescencia. Cuando se forma el lipoplejo, las cargas positivas se compensan parcialmente sólo en una cara de la bicapa debido a que el DNA es compactado en su superficie, lo que conlleva a la reducción de la cabeza polar efectiva de los lípidos catiónicos, produciendo una asimetría en la presión de empaquetamiento.<sup>6</sup> Este hecho desestabiliza la bicapa, lo que fomenta la fusión y/o agregación de los lipoplejos. Para analizar el reordenamiento de las multilamelas en los lipoplejos multilamelares y determinar la periodicidad de las bicapas lipídicas, se han analizado varias micrografías con ayuda del procesador de imagen EMAN,<sup>7</sup> con el cuál se ha realizado un filtrado para eliminar el ruido de alta frecuencia (Figura 9 del Art. 2). Los niveles de densidad máximos y mínimos del conjunto de micrografías estudiadas han revelado un comportamiento repetitivo, de modo que midiendo el número de píxeles entre máximos y transformándolos en *nm*, se ha podido determinar la distancia entre las repeticiones a los distintos valores de la fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , analizados. Los valores obtenidos para el espaciado interlamelar han sido similares e independientes de  $\alpha$ , siendo el valor promedio de  $(6,9 \pm 0,3)$  *nm*. Este valor confirma la compactación de las dobles hélices de DNA mediante una estructura multilamelar tipo “*sandwich*” de  $(4,2 \pm 0,3)$  *nm* de espesor de la bicapa lipídica y de  $(2,7 \pm 0,3)$  *nm* de espesor de la monocapa donde se ubica el DNA. Sin embargo, el cálculo más riguroso de estos parámetros es el efectuado a partir de las medidas de SAXS que se van a analizar a continuación.

Con la técnica de dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) se ha determinado la estructura de los lipoplejos catiónicos DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA, lo que ha permitido verificar los datos obtenidos a partir de las micrografías obtenidas con crio-TEM. El estudio se ha realizado para los dos lipoplejos a seis fracciones molares de

CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y a tres relaciones de carga,  $CR$ , superiores a la electroneutralidad ( $CR > 1$ ).



**Figura 3.2.** Difractogramas de SAXS del lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA, a diferentes fracciones molares de CL,  $\alpha$ , en el liposoma mixto. a)  $CR = 3$ ; b)  $CR = 5$ ; y c)  $CR = 7$ . La [ctDNA] se ha variado desde 0,6 mg/mL hasta 2,0 mg/mL y la relación de masas [L/D] se ha variado desde 5 hasta 32.

Las Figuras 4 del Art. 1, 10 del Art. 2 y la Figura 3.2 de este apartado muestran la intensidad vs el vector de ondas,  $q$ , donde se pueden observar los picos de Bragg obtenidos para los distintos difractogramas. Para los dos lipoplejos, DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA, a valores de fracción molar de CL en el liposoma mixto  $\alpha \geq 0,4$ , los picos de cada difractograma indexan correctamente a una estructura lamelar,  $L_\alpha$ , con un espaciado entre capas,  $d$ , relacionado directamente con el vector  $q$ , que para el primer pico es  $d = 2\pi/q_{100}$ . Según esta estructura lamelar (Esquema 2 del Art. 2), los lipoplejos se pueden representar como capas alternas de bicapas lipídicas mixta y de monocapas acuosas donde se encuentran las dobles hélices de DNA. El espaciado  $d$  se corresponde con la suma del espesor de la bicapa lipídica,  $d_m$ , y la monocapa acuosa de DNA,  $d_w$  (Figura 2.12). El

pico que no corresponde a la estructura lamelar ha sido asignado a la correlación DNA-DNA en la monocapa acuosa, de modo que, a partir del valor de  $q_{DNA}$ , se ha obtenido la separación entre las dobles hélices de DNA en dicha monocapa,  $d_{DNA}(=2\pi/q_{DNA})$ .

Los valores del espaciado,  $d$ , obtenidos se han representado vs la fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , en las Figuras 5 del Art. 1 y 11 del Art. 2. Se puede observar como el espaciado  $d$  se mantiene prácticamente constante para los dos lipoplejos ( $(6,8 \pm 0,2) \text{ nm}$  para el DC-Chol/DOPE-ctDNA y  $(6,6 \pm 0,2) \text{ nm}$  para el DOEPC/DOPE-ctDNA), lo que era de esperar debido a que tanto los dos lípidos catiónicos como el lípido zwitteriónico poseen una longitud de región hidrofóbica similar (en el caso del DOEPC y el DOPE es idéntica), lo que significa que el espesor de la bicapa lipídica del liposoma mixto,  $d_m$ , debe ser independiente: (a) de la fracción molar de CL,  $\alpha$ , en el liposoma mixto para un mismo lipoplejo, y (b) de que se sustituya el DC-Chol por DOEPC, a una misma fracción molar de CL,  $\alpha$ , en el liposoma mixto. Teniendo en cuenta los valores de  $d_m$  ( $4,5 \text{ nm}$ , para el DC-Chol/DOPE-ctDNA<sup>1</sup> y  $4,4 \text{ nm}$  para el DOEPC/DOPE-ctDNA (Art. 2)) obtenidos mediante crio-TEM, el valor de  $d_w$  será de  $(2,3 \pm 0,2) \text{ nm}$  y  $(2,2 \pm 0,2) \text{ nm}$ , respectivamente, es decir,  $d_w$  también es similar e independiente de  $\alpha$  para los dos lipoplejos. En resumen, los parámetros  $d$  y  $d_w$  obtenidos para la estructura lamelar ( $\alpha \geq 0,4$ ) son independientes de  $\alpha$ ,  $L/D$  y  $CR$ , y siendo  $d_w$  suficiente para alojar una monocapa de dobles hélices de DNA hidratadas. Por último, resaltar que los valores de  $d$  obtenidos a partir de las micrografías de crio-TEM, discutidos en un párrafo anterior de este apartado, son completamente concordantes (dentro del error experimental) con los obtenidos a partir del estudio de SAXS.

Las Figuras 6 del Art.1 y 12 del Art. 2 muestran cómo la separación entre las dobles hélices de DNA,  $d_{DNA}$ , se mantiene prácticamente constante e independiente de  $CR$ ,  $L/D$  y  $\alpha$  en el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA obteniendo un valor promedio de  $d_{DNA} = (5,2 \pm 0,2) \text{ nm}$ , mientras que en el lipoplejo DOEPC/DOPE-ctDNA disminuye ligeramente (de  $5,0$  a  $4,0 \text{ nm}$ ) con  $\alpha$ , a las 3 relaciones de carga,  $CR$ , estudiadas. En el lipoplejo DOEPC/DOPE-ctDNA, la disminución de  $d_{DNA}$  con  $\alpha$  es lo esperado teniendo en cuenta que a medida que aumenta la cantidad de lípido catiónico,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, la estructura debe contener también una mayor cantidad de DNA y por tanto debe disminuir la separación entre las dobles hélices de DNA.<sup>8</sup> Sin embargo, la independencia de  $d_{DNA}$  con  $\alpha$  encontrada en el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA, se ha justificado por el hecho de que en la bibliografía se ha encontrado que dicho parámetro presenta dos comportamientos

diferentes en función de  $L/D$  (a  $CR$  constante).<sup>9</sup> A una relación  $L/D$  baja o moderada ( $L/D < 5$ ),  $d_{DNA}$  disminuye al aumentar  $L/D$  como era de esperar, pero permanece constante a  $L/D > 5$ , siendo además la fuerza iónica de la disolución elevada (como es el caso de la disolución fisiológica utilizada en el Art. 1). De este modo, a una elevada fuerza iónica y a altos valores de  $L/D$  se produce un exceso de liposoma mixto en el sistema, de modo que deben coexistir los liposomas libres y los lipoplejos.<sup>8</sup> Habida cuenta que el estudio de SAXS se ha realizado en un medio fisiológico con una fuerza iónica moderadamente alta (160 mM) y con valores de  $L/D$  en el intervalo  $5 < L/D < 34$ , la independencia de  $d_{DNA}$  con  $\alpha$  observada está de acuerdo con el comportamiento encontrado en la bibliografía en esas condiciones.<sup>9</sup>

Por otro lado, para los dos lipoplejos, DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA, a valores de fracción molar de CL en el liposoma mixto  $\alpha = 0,2$ , los picos de cada difractograma (Figuras 4 del Art. 1, 10 del Art. 2 y Figura 3.2 de este apartado) indexan correctamente a una estructura hexagonal invertida,  $H_{II}^C$ . El espaciado de la celdilla unidad está directamente relacionado con el factor  $q$  ( $d = a = d_{DNA} = 4\pi/3^{(1/2)}q_{10}$ ). En esta estructura hexagonal invertida (Esquema 2 del Art. 2) las dobles hélices de DNA están rodeadas por micelas cilíndricas inversas en ordenamiento hexagonal, mayoritariamente de DOPE, puesto que se está a  $\alpha = 0,2$ . La periodicidad,  $d$  ( $= d_{DNA}$ ), calculada a  $\alpha = 0,2$  es independiente de la relación de cargas,  $CR$ , (Figura 12 del Art. 2) siendo el valor promedio obtenido  $d = d_{DNA} = (7,8 \pm 0,2) \text{ nm}$ , tanto para el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA como para el DOEPC/DOPE-ctDNA. El valor del espaciado,  $d$ , obtenido indica claramente que en la estructura hexagonal invertida,  $H_{II}^C$ , las dobles hélices de DNA se encuentran bastante más separadas que en la estructura lamelar,  $L_\alpha$ . Si asumimos que el espesor de la bicapa lipídica del liposoma mixto,  $d_m$ , es similar al de la estructura lamelar ( $d_m \sim 4,5 \text{ nm}$ ), el diámetro interno obtenido de las micelas cilíndricas invertidas,  $d_w$  ( $\sim 3,3 \text{ nm}$ ) es lo suficientemente grande para que éstas puedan alojar las dobles hélices de DNA hidratadas.

En la bibliografía está confirmado<sup>2,10</sup> que en una etapa temprana del proceso de transfección, la interacción entre los lipoplejos con carga positiva y la membrana celular cargada negativamente dependen en buena medida de la estructura del lipoplejo, de la presencia de lípido coadyuvante en el lipoplejo y de la vía de entrada en la célula, siendo, en general, endocitosis la vía más eficiente para este tipo de lipoplejos. Los lipoplejos con estructura lamelar son capturados por los endosomas y permanecen estables, siendo relativamente bajo el grado de liberación del DNA en el citoplasma celular, mientras que

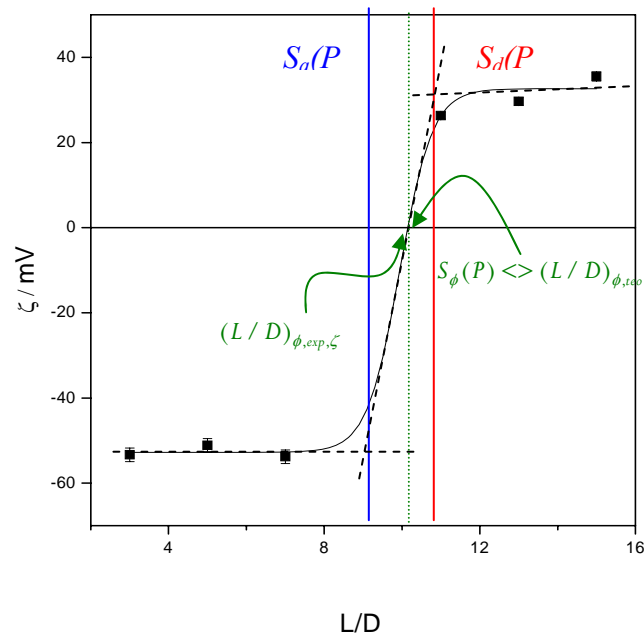
los lipoplejos con estructura hexagonal invertida se fusionan rápidamente con la membrana endosomal aniónica, dando lugar a la destrucción de la estructura hexagonal condensada del lipoplejo y liberando más fácilmente el DNA en el citoplasma, lo que en definitiva conlleva una mayor eficiencia en el proceso de transfección. Por tanto, se puede concluir que los dos lipoplejos analizados en este apartado DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA son potencialmente eficaces para ser utilizados como vectores de transferencia génica, por supuesto por encima de la electroneutralidad ( $CR > 1$ ), y preferentemente a fracciones molares de lípido catiónico bajas o moderadas, región donde se ha encontrado la estructura hexagonal.

El proceso de formación de los lipoplejos se ha abordado también desde un punto de vista **teórico**. El punto de partida ha sido suponer que los lipoplejos se forman como resultado de la interacción entre partículas esféricas cargadas y contraiones multivalentes o polielectrolitos con carga negativa. Si la concentración de contraiones que están alrededor de una superficie cargada promueve que la carga de todos los contraiones sea mayor que la carga de la superficie, puede producirse un proceso de sobrecarga o inversión de carga. El requisito de esta inversión de carga es la existencia de la interacción entre las superficies cargadas, por lo que debe existir una correlación en la carga y en el tamaño.<sup>11</sup> Como la teoría de la interfase electrizada de Poisson-Boltzmann no tiene en cuenta el tamaño de los iones para describir la correlación entre iones de gran tamaño, Nguyen y Shklovskii propusieron un modelo, conocido como *teoría de agregación-desagregación*, que tiene en cuenta esta correlación entre iones multivalentes.<sup>12,13</sup> La teoría de Nguyen y Shklovskii, que presenta ciertas limitaciones puesto que sólo tiene en cuenta las correlaciones de corto alcance entre los contraiones, ha sido modificada posteriormente por Sennato y col.,<sup>10,14</sup> y aplicada a sistemas constituidos por grandes polielectrolitos negativos y un elevado número de partículas esféricas cargadas positivamente. Los desarrollos teóricos conducen a la determinación del diagrama de fases de los complejos esfera catiónica-polianión,<sup>10,14</sup> en los cuáles se tiene en cuenta la inversión de carga y el proceso de condensación al que conduce la agregación. En el Art. 1 de esta Tesis, se ha aplicado el modelo teórico desarrollado por Sennato, posteriormente particularizado para lipoplejos por nuestro grupo,<sup>15,16</sup> para el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA, de modo que las partículas cargadas del modelo de Sennato son liposomas mixtos (lípidos catiónico-lípido zwitteriónico de geometría esférica cuya carga es mayor que la de los polianiones), y el DNA. El objetivo ha sido el de obtener el diagrama de fases de este lipoplejo, resolviendo las ecuaciones 4 y 5 (Art. 1) mediante



un programa informático de cálculo iterativo, elaborado y puesto a punto por nuestro grupo en colaboración con el Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides de la Universidad de Granada en publicaciones anteriores.<sup>15,16</sup> Este método de cálculo ha permitido obtener los valores de los parámetros fenomenológicos  $P_0$  y  $E_0$ , que informan de la concentración de DNA en equilibrio con los lipoplejos, y de la fuerza de la interacción liposoma-DNA, respectivamente, haciendo uso de las concentraciones  $S_a$ ,  $S_d$  y  $S_\phi$  (concentraciones a las que se produce la agregación y la desagregación de los lipoplejos, y la que da lugar a la electroneutralidad, respectivamente). Estas concentraciones han sido determinadas experimentalmente a partir de la curva sigmoideal de potencial zeta (ecuaciones 6 y 7 del Art. 1). En la figura 3.3 se muestra, a modo de ejemplo, para el sistema DOEPC/DOPE-ctDNA, los valores de potencial zeta a partir de los cuales se han obtenido  $S_a(P)$  y  $S_d(P)$ . El modelo ha permitido calcular las concentraciones límite de lipoplejos en función de distintas concentraciones de DNA presentes en el sistema, lo que conduce a la obtención del diagrama de fases del lipoplejo al que da lugar el proceso de complejación, mediante el cual los lipoplejos se agregan y desagregan en función de la relación  $L/D$ . Una vez construido el diagrama de fases, se ha logrado predecir cuál es la concentración óptima de DNA y de liposoma mixto que da lugar a la formación de lipoplejos desagregados estables en disolución.<sup>15,16</sup>

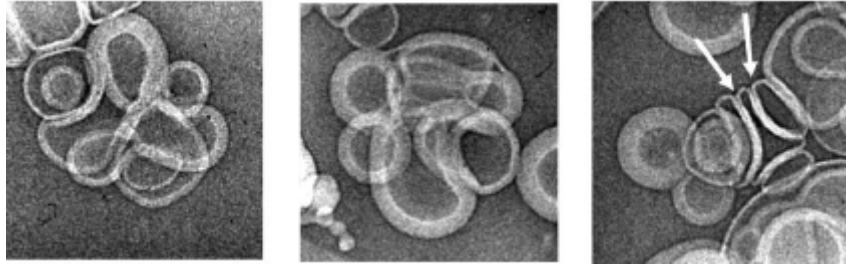
Los valores de los parámetros obtenidos con este modelo (Tabla 1 del Art. 1) confirman que a  $CR > 1$  la gran mayoría del DNA se encuentra en forma de lipoplejo ( $P_0 \ll P$ ), lo que está de acuerdo con lo observado mediante la técnica de crio-TEM. Además, el modelo predice correctamente que: (a) la condensación del DNA por el liposoma mixto es espontánea ( $E_0 \ll kT$ ) a todos los valores de fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , analizadas (0,25, 0,50 y 1), y (b) el ligero aumento de  $E_0$  con  $\alpha$  corrobora la mayor interacción entre el DNA y el lípido catiónico que entre el DNA y el lípido zwitteriónico. El diagrama de fases obtenido para el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA para los 3 valores de  $\alpha$  predice que a una determinada concentración de liposoma,  $P$ : i) a  $S < S_a(P)$  se forman lipoplejos aniónicos estables en equilibrio con DNA libre, ii) a  $S_a(P) < S < S_d(P)$  los lipoplejos se agregan formando “clusters” con una carga neta en torno a cero (electroneutralidad), y iii) a  $S > S_d(P)$  los “clusters” de lipoplejos se desagregan dando lugar a lipoplejos catiónicos estables en equilibrio con liposomas mixtos catiónicos.



**Figura 3.3.** Valores de potencial zeta,  $\zeta$ , obtenidos experimentalmente para el sistema DOEPC/DOPE-ctDNA, para  $\alpha = 0,25$ , a partir de los cuales se han obtenido los parámetros de ajuste  $S_a(P)$ , concentración de liposomas en la agregación (línea azul), y  $S_d(P)$ , concentración de liposomas en la desagregación (línea roja) entre las que se produce la formación de “clusters” de lipoplejos. La línea verde de puntos representa el valor de  $S_\phi(P)$  obtenido con la teoría de agregación-desagregación, transformado convenientemente a  $(L/D)_{\phi,teo}$ , para el que los “clusters” de lipoplejos son eléctricamente neutros.

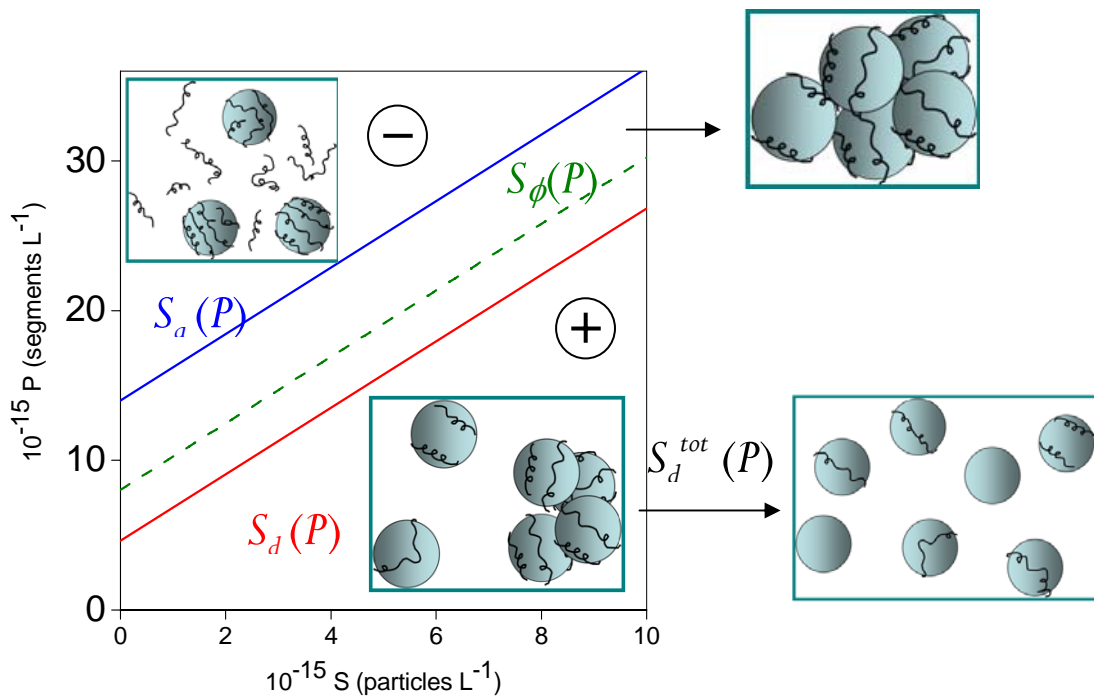
Sin embargo, las micrografías de crio-TEM para este sistema, obtenidas previamente por nuestro grupo para  $S > S_d(P)$ ,<sup>1,3,15</sup> ponen de manifiesto que por encima de  $S_d(P)$  también se encuentran “clusters” de lipoplejos de muy variada morfología, que la teoría sólo predice en el intervalo comprendido entre  $S_a(P)$  y  $S_d(P)$ , además de los lipoplejos libres anteriormente comentados (ver Figura 3.4, a modo de ejemplo). La aparición del fenómeno de agregación de lipoplejos fuera del intervalo teórico ha sido explicado por nuestro grupo previamente,<sup>1</sup> concluyendo que  $S_d(P)$  es una concentración umbral mínima, pero no suficiente, para que los “clusters” se desagreguen. Es decir,  $S_d(P)$  marca el comienzo del proceso de desagregación; a partir de esta concentración, existe un intervalo de concentraciones y/o relaciones  $L/D$  en el que coexisten “clusters” de lipoplejos y lipoplejos libres (Esquema 2 del Art. 1). Es posible y esperable que si se sigue aumentando la concentración de liposomas, se llegue a una  $S_d^{tot}(P)$  a partir de la cual todos

los “clusters” de lipoplejos estén desagregados. Este intervalo ( $S > S_d^{tot}(P)$ ), sin embargo, no se ha analizado experimentalmente en los experimentos de crio-TEM.



**Figura 3.4.** Lipoplejos de DC-Chol/DOPE/ct-DNA a  $L/D = 8,1$ . Detalles extraídos de la Figura 9 de la referencia 1.

El esquema que se muestra a continuación (Figura 3.5) resume las transiciones encontradas o predichas por el modelo de agregación-desagregación, en concordancia con los resultados experimentales de crio-TEM, en un intento por conciliar los resultados experimentales y los teóricos:



**Figura 3.5.** Esquema del modelo semiempírico de agregación-desagregación. En exceso de DNA se forman lipoplejos con carga neta negativa. Si  $S$  aumenta y se sobrepasa  $S_a(P)$ , el sistema condensa y se forman “clusters” de lipoplejos eléctricamente neutros. Si se incrementa  $S$  y se sobrepasa  $S_d(P)$ , los “clusters” comienzan a desagregarse de manera que coexisten con lipoplejos libres hasta  $S_d^{tot}(P)$ , concentración a partir de la cual todos los “clusters” se han desagregado completamente en lipoplejos de carga positiva en presencia de un exceso de liposomas mixtos catiónicos.

Además, el modelo predice que el intervalo de concentraciones ( $S_a(P) < S < S_d(P)$ ) en el que existen los “clusters” de lipoplejos: (1) es más amplio a medida que disminuye el valor de  $\alpha$  del liposoma mixto, y (2) se desplaza hacia concentraciones mayores,  $S$ , a medida que aumenta el valor de  $\alpha$ . El modelo también ha permitido estimar los valores de los parámetros,  $S_\phi$  y  $(L/D)_\phi$ , en la electroneutralidad (ecuaciones 6 y 7 del Art. 1), los cuales están en completo acuerdo con los determinados experimentalmente mediante el potencial zeta (Figura 1 del Art. 1). La línea de electroneutralidad a  $\alpha = 0,5$  (valores de  $S_\phi$  a distintos valores de DNA) obtenida para el lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA se ha comparado con las obtenidas para otros lipoplejos de un estudio anterior de nuestro grupo, lo que ha conducido a interesantes conclusiones. Así, es de destacar que, para una concentración determinada de DNA,  $P$ , las líneas de electroneutralidad se desplazan a concentraciones mayores de liposoma mixto siguiendo el siguiente orden de lipoplejos: DC-Chol/DOPE-ctDNA < DODAB/DOPE-ctDNA < DSTAP/DOPE-ctDNA < DODAB/DLPC-ctDNA, es decir, los lipoplejos con DOPE como lípido coadyuvante requieren menor cantidad de liposomas mixtos para producir el cambio de inversión de signo, lo que resulta altamente beneficioso debido a la menor citotoxicidad que producirían en el proceso de transfección celular y confirma de nuevo al DOPE como uno de los lípidos coadyuvantes más apropiados. En este mismo sentido, y a la vista de la comparación anterior, el lípido catiónico DC-Chol utilizado en este estudio parece tener mejor comportamiento que los lípidos catiónicos monovalentes derivados de las dialquilaminas (DODAB) o dioles (DSTAP).

Aunque el modelo de complejación descrito por Nguyen y Shklovskii predice cualitativamente bastante bien los resultados experimentales, Sennato y col.<sup>10</sup> expusieron que esta teoría podía ser mejorada si se tenía en cuenta el efecto de condensación de Manning,<sup>17</sup> efecto que ya había sido utilizado ampliamente en estudios de simulación en sistemas de adsorción de polielectrolitos con partículas cargadas.<sup>18-21</sup> (apartado 2.4 de esta Tesis y Art. 2). Por ello, el análisis teórico del lipoplejo DOEPC/DOPE-ctDNA (Art. 2), ha sido realizado introduciendo cálculos teóricos que permiten renormalizar las cargas tanto de los liposomas mixtos,  $Q_{ren}$ , como para los fragmentos de DNA,  $q_{ren}$ , en lugar de hacerlo tomando en cuenta las cargas de una completa ionización de sus grupos cargados.<sup>10</sup> Para la renormalización de la carga de los liposomas mixtos se ha utilizado una expresión que depende de la fracción en volumen del liposoma mixto,<sup>10</sup> pero que en esta Tesis se ha mejorado utilizando un cálculo basado en el modelo *jellium* que ha funcionado con éxito

en la estimación de cargas renormalizadas de liposomas con partículas de látex.<sup>22,23</sup> La renormalización de la carga del ctDNA se ha efectuado utilizando el mismo modelo propuesto por Sennato y col.<sup>10</sup> para un polión cargado basado en la longitud de Bjerrum. Con la renormalización de las cargas del liposoma mixto y del DNA se ha pretendido disminuir la energía libre del sistema, la cuál depende de la fracción de DNA en los agregados y del número de pares de bases de DNA que interaccionan con el liposoma mixto. El modelo mejorado en esta Tesis tiene en cuenta las fracciones en volumen, es decir, los volúmenes parciales del liposoma mixto, del DNA y del medio fisiológico, que en nuestro caso ha sido PBS (160 mM,  $pH = 7,4$ ).<sup>22,23</sup>

Como se observa en la Figura 13 (Art. 2), un aumento de la carga de liposomas produce un aumento lineal de la carga renormalizada,  $Q_{ren}$ , del liposoma a bajos valores de  $Q$ , pero tiende a un régimen de saturación a altos valores de  $Q$ , donde un aumento de la carga de liposomas apenas afecta su carga. La renormalización de la carga tiene un notable efecto en las propiedades electroquímicas de los liposomas como han confirmado Bordi y col.<sup>24</sup> en vesículas de lípidos. El modelo de Sennato y col. modificado en esta Tesis se ha aplicado a los dos sistemas de lipoplejos de este apartado, DOEPC/DOPE-ctDNA y DC-Chol/DOPE-ctDNA, este último analizado previamente con el modelo de Sennato original en el Art. 1. Inicialmente se han obtenido los valores del parámetro  $E_0$  y de la concentración de liposomas en la electroneutralidad,  $S_0$  (ó  $S_\phi$ ), (ecuación (2) del Art. 2) utilizando para ello los valores experimentales,  $S_a$  y  $S_d$ , obtenidos de la curvas sigmoidales de potencial zeta, para las distintas fracciones molares de lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , estudiadas (Tabla 3 del Art. 2). Los valores de  $E_0$  obtenidos son mayores que los calculados con el modelo original de Sennato y col. para el DC-Chol/DOPE-ctDNA (Art. 1) puesto que el modelo modificado en esta Tesis incluye también el efecto de la fuerza iónica del medio. Los valores de la concentración de liposomas en la electroneutralidad,  $S_0$  (ó  $S_\phi$ ) (directamente relacionados con  $(L/D)_\phi$ ) están en muy buen acuerdo con los determinados experimentalmente con el potencial zeta (Figura 4 del Art. 2). Finalmente, a partir de las cargas renormalizadas del liposoma mixto y del DNA y haciendo uso de la ecuación (1) del Art. 2, ha sido posible calcular la carga renormalizada de los lipoplejos DOEPC/DOPE-ctDNA y DC-Chol/DOPE-ctDNA, a distintas concentraciones del liposoma mixto y a todos los valores de la fracción molar de lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , estudiados (Figura 14 del Art. 2). Esta Figura 14 ( $Q^*/Q_{ren}$  vs  $S$ ) presenta el mismo hábito que el potencial zeta vs  $L/D$  (Figura 1 del Art. 2) lo que ha

supuesto un éxito del modelo propuesto y confirma que la interacción electrostática juega un papel crucial en la formación del lipoplejo. Sin embargo, el modelo predice que aunque la carga de los liposomas mixtos favorece la formación de lipoplejos (liposoma-DNA), cuando se alcanza la saturación (liposomas en exceso con respecto a la cantidad de DNA presente) el número de segmentos de DNA unidos a cada liposoma no depende de la carga del liposoma mixto. Los resultados teóricos (Figura 14 del Art. 2) muestran también que el efecto de la fracción molar del lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , en la carga del lipoplejo está de acuerdo con los obtenidos experimentalmente (Figuras 1 y 4 del Art. 2).

### 3.1.3. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Rodríguez-Pulido, A.; Ortega, F.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12555.
- (2) Ewert, K.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Lin, A. J.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 133.
- (3) Rodríguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Llorca, O.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2187.
- (4) Regelin, A. E.; Fankhaenel, S.; Gurtesch, L.; Prinz, C.; von Kiedrowski, G.; Massing, U. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1464*, 151.
- (5) Safinya, C. R.; Ewert, K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Raviv, U.; Needleman, D. J.; Lin, A. J.; Slack, N. L.; George, C.; Samuel, C. E. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A*: **2006**, *364*, 2573.
- (6) Huebner, S.; Battersby, B. J.; Grimm, R.; Cevc, G. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 3158.
- (7) Ludtke, S. J.; Baldwin, P. R.; Chiu, W. *J. Struct. Biol.* **1999**, *128*, 82.
- (8) Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 915.
- (9) Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Science* **1997**, *275*, 810.
- (10) Sennato, S.; Bordi, F.; Cametti, C. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 4936.
- (11) Martín-Molina, A. Propiedades electrocinéticas de sistemas coloidales modelo. Efecto del tamaño iónico, Universidad de Granada, **2003**.
- (12) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 5905.
- (13) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 7298.
- (14) Sennato, S.; Bordi, F.; Cametti, C.; Di Biasio, A.; Diociaiuti, A. *Colloids Surf. A* **2005**, *270-271*, 138.
- (15) Rodríguez-Pulido, A.; Martín-Molina, A.; Rodríguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648.
- (16) Rodríguez-Pulido, A.; Casado, A.; Muñoz-Ubeda, M.; Junquera, E.; Aicart, E. *Langmuir* **2010**, *26*, 9378.
- (17) Manning, G. S. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 924.
- (18) Tian, W. D.; Ma, Y. Q. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 13161.
- (19) Voulgarakis, N. K.; Rasmussen, K. O.; Welch, P. M. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*.
- (20) Deserno, M.; Jimenez-Angeles, F.; Holm, C.; Lozada-Cassou, M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10983.
- (21) Chodanowski, P.; Stoll, S. *Macromolecules* **2001**, *34*, 2320.
- (22) Haro-Perez, C.; Quesada-Fernandez, M.; Callejas-Fernandez, J.; Sabate, E.; Estelrich, J.; Hidalgo-Alvarez, R. *Colloids Surf. A* **2005**, *270*, 352.
- (23) Haro-Perez, C.; Quesada-Perez, M.; Callejas-Fernandez, J.; Shurtenberger, P.; Hidalgo-Alvarez, R. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, *18*, L363.
- (24) Bordi, F.; Cametti, C.; Sennato, S.; Paoli, B.; Marianecchi, C. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 4808.

## **3.2. LIPOPLEJOS CON LÍPIDOS CATIÓNICOS GEMINI DE DOS CABEZAS POLARES**

### **3.2.1. RESULTADOS**

Hasta la fecha, la investigación llevada a cabo por nuestro grupo estaba centrada única y exclusivamente en el estudio biofísico de los lipoplejos. Sin embargo, gracias a la colaboración establecida (ACI2009-0867) con el grupo de los Dptos. de Química Orgánica y de Desarrollo Molecular y Genética del Indian Institute of Science, Bangalore (India), en este apartado de la Tesis, la caracterización de los lipoplejos se ha extendido también al estudio bioquímico. Además, (a) los lípidos catiónicos utilizados han sido sintetizados específicamente para mejorar el comportamiento y la biodisponibilidad que ofrecen los lípidos comerciales y, (b) la utilización de un plásmido de DNA tanto en el estudio biofísico como en el bioquímico, en contraste con lo que se venía haciendo tradicionalmente, que era llevar a cabo la caracterización biofísica con un DNA comercial de diversa fragmentación, y la transfección celular con plásmidos circulares. Esta unificación tanto del DNA escogido como de las condiciones de los experimentos ha resultado sorprendentemente novedosa y ha supuesto un punto de inflexión cara al futuro de este campo, a la hora de realizar un estudio sistemático de los lipoplejos desde los dos enfoques, biofísico y bioquímico. En resumen, los resultados que se recogen en este apartado indican que para alcanzar conclusiones satisfactorias y sobre todo correctas, ambos estudios, biofísico y bioquímico, no pueden ser llevados a cabo de forma independiente.

El apartado se ha centrado inicialmente en analizar algunos aspectos de varios lípidos comerciales monovalentes, pero el soporte fundamental del trabajo aquí presentado ha estado basado en la familia de lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE$ -pDNA, siendo  $n = 2, 3, 5$  ó  $12$ , el número de metilenos de una cadena alquílica espaciadora de variada longitud que une las dos cabezas catiónicas de amonio de los lípidos gemini (Figura 2.1 del Cap. 2). Para su caracterización se han utilizado diversas técnicas experimentales biofísicas y bioquímicas, con el objetivo de determinar la capacidad de compactación y transporte de un plásmido DNA circular superenrollado (pDNA) y la eficiencia de su transfección a las células vivas mediante liposomas mixtos formados por la serie de lípidos catiónicos sintetizados especialmente para este estudio, y el lípido coadyuvante DOPE.



Los resultados obtenidos han permitido analizar la influencia en las distintas propiedades biofísicas y bioquímicas: el tipo de cabeza polar de los lípidos catiónicos gemini (su estructura); la longitud,  $n$ , de la cadena espaciadora entre las cabezas catiónicas del lípido; la fracción molar del lípido catiónico,  $\alpha$ , en el liposoma mixto; el efecto que produce el DOPE como lípido coadyuvante; las cargas efectivas del lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , y del plásmido DNA,  $q_{pDNA}^-$ ; la relación de masas lípido/DNA en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ ; la relación de cargas efectiva,  $\rho_{eff}$ , entre el lípido catiónico y el pDNA; el tipo de interacción que se produce entre los liposomas mixtos y el DNA y; la estructura, forma, tamaño, morfología y propiedades electroquímicas superficiales que presentan los lipoplejos al formarse. Los estudios biofísicos han sido complementados en el IISc, Bangalore (India) donde la Doctoranda ha participado activamente en la realización de los estudios bioquímicos necesarios para determinar la eficiencia en la transfección del pDNA y la citotoxicidad de los vectores liposomales utilizados, así como confirmar, mediante experimentos *in vitro*, las evidencias encontradas con los experimentos biofísicos.

El estudio que se presenta aquí, junto con el realizado en el apartado anterior y resultados previos de la bibliografía, ha permitido analizar también el efecto que tiene en las distintas propiedades biofísicas y bioquímicas el que los lípidos catiónicos que forman los vectores liposomales sean monovalentes (una cabeza catiónica) o multivalentes gemini (dos cabezas catiónicas).

Los resultados experimentales se presentan agrupados en dos artículos que se adjuntan a continuación:

**Art.3.** *Why is Less Cationic Lipid Required To Prepare Lipoplexes from Plasmid DNA than Linear DNA in Gene Therapy?*

M. Muñoz-Úbeda; S. K. Misra; A. L. Barrán-Berdón; C. Aicart-Ramos; M. B. Sierra; J. Biswas; P. Kondaiah; E. Junquera; S. Bhattacharya; E. Aicart  
*J. Am. Chem. Soc. (JACS)* **2011**, *133*, 18014-18017

**Art.4.** *How Does Spacer Length of Cationic Gemini Lipids Influence the Lipoplex Formation with Plasmid DNA? Physicochemical and Biochemical Characterizations and Their Relevance in Gene Therapy*

M. Muñoz-Úbeda; S. K. Misra; A. L. Barrán-Berdón; S. Datta; C. Aicart-Ramos; P. Castro-Hartmann; P. Kondaiah; E. Junquera; S. Bhattacharya; E. Aicart  
*Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3926-3937.

### **Art.3. Why is Less Cationic Lipid Required To Prepare Lipoplexes from Plasmid DNA than Linear DNA in Gene Therapy?**

M. Muñoz-Úbeda; S. K. Misra; A. L. Barrán-Berdón; C. Aicart-Ramos; M. B. Sierra; J. Biswas; P. Kondaiah; E. Junquera; S. Bhattacharya; E. Aicart  
*J. Am. Chem. Soc. (JACS)* **2011**, *133*, 18014-18017

Hasta la fecha, la caracterización biofísica de lipoplejos se venía realizando con fragmentos de DNA lineal de doble hebra comercial procedentes de la glándula tímica (o timo) de ternero (*calf Thymus*, ctDNA) y los resultados obtenidos se tomaban como punto de partida para los ensayos bioquímicos, los cuáles utilizaban diversos tipos de plásmido DNA (pDNA). Con ello se estaba asumiendo que el ctDNA y el pDNA se comportaban de modo similar cuando interaccionaban con los liposomas mixtos para formar los lipoplejos. Sin embargo, esta publicación, pionera en realizar los experimentos biofísicos y bioquímicos de los lipoplejos de forma sistemática, en las mismas condiciones, y sobre todo, utilizando en todos los experimentos el mismo plásmido de DNA, ha confirmado que la suposición de que el ctDNA y el pDNA se comportan por igual es completamente errónea.

Este trabajo ha demostrado que el ctDNA lineal y el pDNA tienen un comportamiento muy diferente ya que, mientras el ctDNA posee una carga efectiva igual a su carga nominal ( $q_{ctDNA}^- = -2$  por par de bases), los liposomas mixtos compactan el plásmido DNA con una gran parte de sus contraiones  $Na^+$  asociados, lo que significa que la carga efectiva del pDNA es bastante menor ( $q_{pDNA}^- \ll |-2|$ ) que la carga nominal que sí posee el DNA lineal (ctDNA). Que la carga efectiva  $q_{pDNA}^-$  sea menor (en valor absoluto) implica que una menor cantidad de liposoma catiónico será necesaria para compactarlo, con la consiguiente disminución de la citotoxicidad del vector génico utilizado, lo que ha tenido importantes implicaciones en este campo, por lo que supone con respecto a la optimización de la cantidad idónea del liposoma mixto a preparar.

En este primer artículo del apartado se ha llevado a cabo un estudio biofísico y bioquímico de la compactación del pDNA por medio de varios CLs monovalentes comerciales (DC-Chol/DOPE, DOEPC/DOPE) y un CL gemini con dos cabezas catiónicas ( $C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2/DOPE$ ). El estudio ha permitido analizar el proceso de formación de los lipoplejos, y los mecanismos de transfección del pDNA mediante estos liposomas mixtos,<sup>1-4</sup> y para ello se ha cubierto un amplio intervalo de fracciones molares del lípido

catiónico,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, y de relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , entre el CL y el pDNA, para así determinar la relación óptima CL-DNA que presente mayor eficiencia en la transfección. Para llevar a cabo el estudio biofísico, se han utilizado las técnicas siguientes: a) la movilidad electroforética o potencial zeta,  $\zeta$ , b) la espectroscopia de fluorescencia (ensayos de intercalación de la sonda fluorescente GelRed) y, c) la electroforesis en gel de agarosa, a partir de las cuáles se ha determinado la carga efectiva del lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , y del plásmido pDNA,  $q_{pDNA}^-$ , la relación de masas lípido/DNA en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , junto con el tipo de interacción existente entre los liposomas mixtos y el pDNA; d) la dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS), que ha aportado información acerca del tipo de estructura que forma el lipoplejo, y e) la crio-microscopia electrónica de transmisión (crio-TEM), con la que se ha determinado la estructura, tamaño y morfología de los lipoplejos. Por otro lado, el estudio bioquímico, necesario para conocer la eficiencia y viabilidad de los lipoplejos, ha necesitado el uso de las siguientes técnicas: a) citometría de flujo (FACS), b) ensayos de reducción de MTT (viabilidad/citotoxicidad) y, c) microscopia confocal de fluorescencia.

Esta amplia caracterización llevada a cabo, ha permitido determinar experimentalmente por primera vez: i) las cargas efectivas del lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , y del plásmido DNA,  $q_{pDNA}^-$ , y ii) la relación de cargas efectiva,  $\rho_{eff}$ , entre el liposoma mixto y el pDNA y ha confirmado que en los estudios bioquímicos es absolutamente necesario utilizar los valores de las cargas y relaciones de carga efectivas que pueden y deben ser determinadas mediante ensayos biofísicos. Las evidencias biofísicas han sido confirmadas con el estudio bioquímico llevado a cabo, concluyendo que la caracterización biofísica del lipoplejo, utilizando el mismo plásmido que en los ensayos bioquímicos, es la vía correcta para encontrar la óptima eficiencia en la transfección del pDNA combinada con una menor toxicidad celular del vector liposomal.

# Why Is Less Cationic Lipid Required To Prepare Lipoplexes from Plasmid DNA than Linear DNA in Gene Therapy?

Mónica Muñoz-Úbeda,<sup>†,⊥</sup> Santosh K. Misra,<sup>§,⊥</sup> Ana L. Barrán-Berdón,<sup>†</sup> Clara Aicart-Ramos,<sup>†</sup> María B. Sierra,<sup>†</sup> Joydeep Biswas,<sup>§</sup> Paturu Kondaiah,<sup>||</sup> Elena Junquera,<sup>†</sup> Santanu Bhattacharya,<sup>\*,§</sup> and Emilio Aicart<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Grupo Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, and <sup>‡</sup>Departamento Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

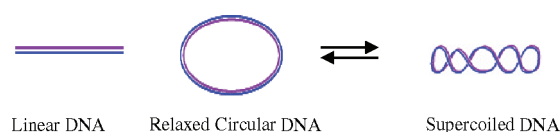
Departments of <sup>§</sup>Organic Chemistry and <sup>||</sup>Molecular Reproduction Development and Genetics, Indian Institute of Science, Bangalore 560012, India

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** The most important objective of the present study was to explain why cationic lipid (CL)-mediated delivery of plasmid DNA (pDNA) is better than that of linear DNA in gene therapy, a question that, until now, has remained unanswered. Herein for the first time we experimentally show that for different types of CLs, pDNA, in contrast to linear DNA, is compacted with a large amount of its counterions, yielding a lower effective negative charge. This feature has been confirmed through a number of physicochemical and biochemical investigations. This is significant for both *in vitro* and *in vivo* transfection studies. For an effective DNA transfection, the lower the amount of the CL, the lower is the cytotoxicity. The study also points out that it is absolutely necessary to consider both effective charge ratios between CL and pDNA and effective pDNA charges, which can be determined from physicochemical experiments.

Gene therapy is a novel branch of medicine with the objective of curing a wide variety of diseases, either by supplementation of damaged cellular DNA or by inserting functional genes in living cells.<sup>1–8</sup> Due to the multianionic character of DNA, its permeation across the negative cellular membranes is limited, and vectors for transporting it are needed. One way to achieve DNA delivery is via the use of viral vectors, which show efficient transfection but cause undesirable immune response. Another possibility is to use cationic lipids or polymers that compact DNA of any length to form lipoplexes<sup>6,8–11</sup> or polyplexes,<sup>12–16</sup> respectively, leading to gene transfection without triggering any immune response. Lipoplexes used in gene therapy are constituted by DNA and a mixture of lipids. The mixed lipids consist of a cationic lipid (CL), which interacts electrostatically with DNA and the cellular membrane, and a helper zwitterionic phospholipid (often DOPE), which decreases the toxicity of CL, increases the bilayer fluidity, and makes membrane fusion easier.<sup>11,17–19</sup> Biophysical and biochemical studies of DNA compaction by CLs shed light on both the lipoplex formation and the transfection mechanisms.<sup>6,8–11</sup> The goal is to select lipid mixtures that form stable lipoplexes with high transfection efficiency and minimum toxicity, together with facile DNA release into the cells. For this, the amount of CL must be kept at the lowest that permits effective DNA transfection.

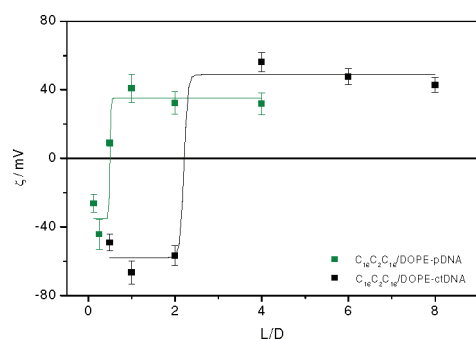
Chart 1. Linear and Plasmid DNA



DNA compaction by CL to form lipoplexes cannot be due only to the Coulombic attractions, because charged macromolecules in solution are surrounded by a sheath of opposite counterions, according to the nonlinear Poisson–Boltzmann theory, which predicts a counterion condensation in the vicinity of its surface (Manning condensation).<sup>20</sup> However, when CL-DNA lipoplexes are formed by positive CL and negative DNA, a percentage of their counterions are released to the solution, resulting in an entropy gain.<sup>12</sup> In addition, CL-DNA lipoplexes must be net cationic to bind to cell surfaces, which suggests that CL charges must be higher than those of DNA in the lipoplex. On the other hand, plasmid DNA (pDNA) is a circular form of DNA that at physiological pH may adopt a supercoiled conformation depending on the ionic strength (Chart 1), while chromosomal DNA fragments, i.e., from calf thymus (ctDNA) or salmon sperm, remain in a linear form. The supercoiling effect renders a less effective negative charge of the biopolymer than its actual charge. Because of this feature and its conformation, it is important to determine the exact amount of CL that is needed to yield a positive lipoplex, which should be adequate for transfection. Indeed, biological studies have shown that pDNA is delivered to cells more efficiently than linear DNA.<sup>21–23</sup> However, why this happens has not been experimentally verified. Also, it must be noted that in biological studies, i.e., transfection or cytotoxicity assays, less CL vector (and, accordingly, less cytotoxicity) could be used. Physicochemical experiments can determine the reasons. However, these are usually done with the cheaper and commercially available linear DNA,<sup>6,9,10,12,24</sup> since large amounts of DNA are needed in such studies. Thus, physicochemical and biological investigations have so far been carried out differently. It is therefore essential that these studies are performed under identical conditions. Herein we report the

Received: May 23, 2011

Published: October 10, 2011



**Figure 1.** Plot of  $\zeta$  potential against lipoplex composition ( $L/D$ ) of  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -ctDNA and  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA at  $\alpha = 0.5$  in HEPES buffer at 298.15 K, pH 7.4. Solid line: sigmoidal fit of experimental values. Errors are within  $\pm 5\%$ ,  $[DNA] = 0.1$  mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on CL composition, to cover a wide  $L/D$  range.

results of our investigations where for the first time both physico-chemical and biological experiments have been performed using pDNA.

Physicochemical characterization of the DNA compaction process requires the knowledge of the mass ratio ( $L/D$ ) between lipid and DNA and the charge ratio ( $\rho$ ) between positive CL and negative DNA phosphate groups. These quantities are related to the CL composition ( $\alpha$ ) of the lipid mixture as given by

$$\alpha = (L^+/M_{L^+}) / [(L^+/M_{L^+}) + (L^0/M_{L^0})] \quad (1)$$

$$\rho = [n^+/n^-] = (q_{L^+}^+ L^+ / M_{L^+}) / (q_{DNA}^- D / \bar{M}_{bp}) \quad (2)$$

where  $L^+$  and  $L^0$  are the masses of the cationic and neutral helper lipids (thus,  $L = L^+ + L^0$ , is the total mass of lipid);  $M_{L^+}$  and  $M_{L^0}$  are the molar masses of cationic and helper lipids;  $D$  is the DNA mass;  $n^+$  and  $n^-$  are the number of moles of positive and negative charges, coming from CL and DNA;  $q_{L^+}^+$  and  $q_{DNA}^-$  are the charges of the CL and DNA base pairs; and  $\bar{M}_{bp}$  is the average molar mass per DNA base pair. In particular, it is important to know the electroneutrality ratio ( $(L/D)_\phi$ ) where the positive and negative charges balance ( $\rho = 1$ ), because it marks the lower limit from which the net charge of the lipoplex is positive, thus becoming a potentially adequate cell transfecting agent.<sup>6,10</sup> This relation must be determined experimentally but can be also estimated (see the Supporting Information (SI)) by combining eqs 1 and 2 with the definition of  $L/D$  ratio, as given by

$$(L/D)_\phi = q_{DNA}^- [\alpha M_{L^+} + (1 - \alpha) M_{L^0}] / (q_{L^+}^+ \alpha \bar{M}_{bp}) \quad (3)$$

To analyze the effect of both DNA conformation and the type of CL on CL-DNA interaction and on the extent of the counterion release, we have employed in this work several lipoplexes formed by (i) a gemini CL, such as 1,2-bis(hexadecyl dimethylammonium)ethane ( $C_{16}C_2C_{16}$ ), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (DOEPC), or 3 $\beta$ -[*N*-(*N'*,*N'*-dimethylamino-ethane)carbamoyl]cholesterol (DC-Chol); (ii) the helper lipid 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE); and (iii) either of the two types of DNA, pEGFP-C3 pDNA or linear ctDNA. It must be mentioned that ctDNA is commercial, whereas the pDNA has been amplified and purified by us. The study has been performed using  $\zeta$  potential, GelRed fluorescence intercalation assay, small-angle X-ray scattering (SAXS), gel electrophoresis, gene transfection, confocal microscopy, and cell viability (cytotoxicity) techniques (see SI).

**Table 1.** Representative  $(L/D)_\phi$  Values Obtained from  $\zeta$  Potential and GelRed Experiments, and Estimated from Eq 3

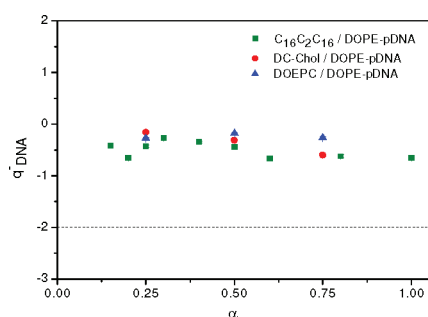
| $\alpha$   | $(L/D)_{\phi,\text{exp}}$ |                       | $(L/D)_{\phi,\text{est}}$ |
|--|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
|  | pDNA                      | ctDNA                 |                           |
| C <sub>16</sub> C <sub>2</sub> C <sub>16</sub> /DOPE |                           |                       |                           |
| 0.15   | 1.6                       | 7.1                   | 7.6                       |
| 0.50   | 0.5; 0.5 <sup>a</sup>     | 2.2                   | 2.3                       |
| 0.80   | 0.4                       |                       | 1.4                       |
| DOEPC/DOPE   |                           |                       |                           |
| 0.25   | 1.3                       | 9.2; 9.0 <sup>a</sup> | 9.5                       |
| 0.50   | 0.5                       | 5.1; 5.6 <sup>a</sup> | 4.9                       |
| 0.75   | 0.4                       | 4.0; 4.2 <sup>a</sup> | 3.5                       |
| DC-Chol/DOPE   |                           |                       |                           |
| 0.25   | 0.8                       | 8.3                   | 8.5                       |
| 0.50   | 0.8                       | 4.2; 4.4 <sup>a</sup> | 3.9                       |
| 0.75   | 1.0                       | 3.4                   | 2.4                       |

<sup>a</sup> GelRed experiments.

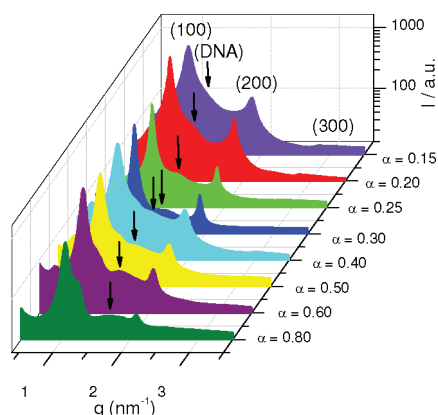
<sup>a</sup> GelRed experiments.

Three methods have been used to determine the electroneutrality ratio: (i)  $\zeta$  potential, since it shows a sign inversion at this particular  $L/D$  value;<sup>10,24</sup> (ii) GelRed fluorescence intercalation assay, since the maximum fluorescence intensity of the probe decreases as soon as it is displaced from the hydrophobic interior of DNA double-helix to the bulk when the lipoplex is formed, reaching a constant value at  $(L/D)_\phi$ ; and (iii) estimated using eq 3, if preassumed values of  $q_{L^+}^+$  and  $q_{DNA}^-$  are used.

Figure 1 shows the variation of  $\zeta$  potential against  $L/D$  for the lipoplexes formed by  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$  at  $\alpha = 0.5$  with pDNA or ctDNA (for other lipoplexes and CL compositions, see SI Figures S-1 to S-6). Two sigmoidal curves are observed, with an inversion of sign taking place at the electroneutrality ratio ( $\rho = 1$ ) for a certain  $(L/D)_\phi$  value. Table 1 reports  $(L/D)_\phi$  determined from the  $\zeta$  potential measurements and from the GelRed fluorescence assays (see SI Figures S-7 and S-8) for the investigated systems at several CL compositions together with  $(L/D)_\phi$  values estimated using eq 3 assuming total release of the counterions when lipoplexes are formed, i.e.,  $q_{L^+}^+ = 2$  for  $C_{16}C_2C_{16}$ ,  $q_{L^+}^+ = 1$  for DOEPC or DC-Chol, and  $q_{DNA}^- = -2$ . For each CL/DOPE-ctDNA lipoplex, an excellent agreement is observed between  $(L/D)_\phi$  values obtained from the  $\zeta$  potential studies or GelRed fluorescence assays and the ones estimated using eq 3. This means that, in all the cases, CL/DOPE is able to release all the  $Na^+$  counterions from ctDNA when lipoplexes are formed. However, in the case of lipoplexes containing pDNA,  $(L/D)_\phi$  values experimentally determined using both  $\zeta$  potential measurements and GelRed fluorescence are considerably lower than those estimated from eq 3. This indicates that a significant percentage of counterions remains bound with the pDNA when the lipoplex is formed. Thus the effective pDNA charge becomes less negative than 2. It is plausible that as a result of a more compact conformation, it may be more difficult for the CLs, due to geometric constraints, to fully match with the charge of the pDNA and displace all the bound counterions of pDNA. Therefore more counterions are still present in the vicinity of the pDNA even after the CL binding. In any case, although a significant percentage of counterions remains associated with the phosphate groups, those that are expelled to the bulk drive the lipoplex formation contributing to a clear entropy gain.<sup>12</sup> Rearranging eq 3



**Figure 2.** Effective pDNA charge for  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE, DC-Chol/DOPE and DOEPC/DOPE mixed lipids against CL composition ( $\alpha$ ). Dashed line corresponds to a preassumed value of  $q_{pDNA}^- = -2$ .

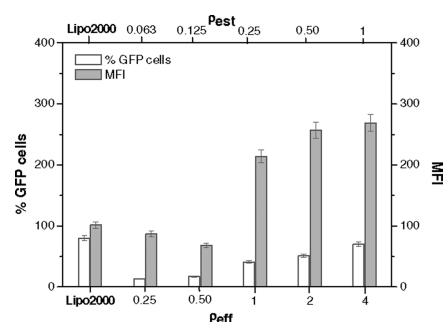


**Figure 3.** SAXS diffractograms of  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes at several CL compositions ( $\alpha$ ) and an effective charge ratio  $\rho_{eff} = 2$ .

and using experimentally determined  $(L/D)_\phi$ , the effective pDNA net charge ( $q_{pDNA}^-$ ) in the lipoplexes may be obtained from

$$q_{pDNA}^- = (L/D)_\phi (q_{L^+}^+ + \alpha \bar{M}_{bp} / [\alpha M_{L^+} + (1 - \alpha) M_{L^0}]) \quad (4)$$

Results of  $q_{pDNA}^-$  for CL/DOPE-pDNA lipoplexes, when plotted against  $\alpha$  in Figure 2, clearly show that pDNA is less negatively charged than expected, being  $q_{pDNA}^- = (-0.4 \pm 0.1)$  per base pair on average, irrespective of the CL composition. This feature implies that a smaller amount of CL is needed to form electrically neutral complexes using pDNA because pDNA is less negatively charged than the linear one, and hence less CL is necessary to obtain a positive lipoplex with pDNA. It is remarkable that this is the first experimental determination of the effective charge on pDNA. More importantly, it opens up the correct way of preparing lipoplexes with the effective charge ratio ( $\rho_{eff}$ ), which unifies both the physicochemical and biological transfection studies. Since  $q_{pDNA}^-$  is around  $-0.4$  on average,  $\rho_{eff}$  is higher than  $\rho$  estimated ( $\rho_{est}$ ) with  $q_{pDNA}^- = -2$ . These results have been further confirmed by SAXS of  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplex at different CL compositions and  $\rho_{eff} = 2$ , since the structure of the lipoplexes is of crucial importance and this is currently of core interest to groups investigating DNA complexation by simulation/theoretical analysis.<sup>25,26</sup> Note that the peaks on diffractograms shown in Figure 3 for the whole range of composition index well with a lamellar structure,  $L_\alpha$ . Values of periodic distance (not shown) of the lamellar structure ( $d$ ) versus  $\alpha$ , at  $\rho_{eff} = 2$ , decrease slightly (7 to 6 nm). This may be attributed to (i) a thinner bilayer ( $d_m$ ) as  $\alpha$  increases, since the length of



**Figure 4.** Transfection (% GFP cells and MFI) of pEGFP-C3 pDNA using  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE in HEK293T cells at  $\alpha = 0.5$  against  $\rho_{eff}$  (bottom) and  $\rho_{est}$  (up). Also shown is the transfection by Lipofectamine2000, as a control.

$C_{16}C_2C_{16}$  gemini CL is shorter than that of DOPE and/or (ii) a higher compaction of pDNA, and consequently a decrease in the thickness where the pDNA is sandwiched ( $d_w$ ) as  $\alpha$  increases (see SI Chart S-1). In any case, if a value of  $d_m \approx 4-5$  nm is assumed for the  $L_\alpha$  structure, the thickness obtained for the pDNA monolayer ( $d_w \approx 2$  nm) is consistent with a highly compacted pDNA conformation compared with linear ctDNA ( $d_w \approx 2.5$  nm).<sup>1,9,27</sup> Values of  $d_{pDNA}$  (not shown), plotted against  $\alpha$ , at  $\rho_{eff} = 2$ , decrease slightly (from 5 to 4 nm). This is expected since, at constant  $\rho_{eff}$ ,  $d_{pDNA}$  should decrease as  $\alpha$  in the lipoplex increases, as previously found for most of the lipoplexes reported in literature.<sup>24,28-30</sup> A comparison between the structures formed by both lipoplexes, CL/DOPE-pDNA and CL/DOPE-ctDNA, indicates that (i) they have similar values (within experimental uncertainty) for the lamellar spacing ( $d$ ) and also for the DNA peak position ( $d_{pDNA}$  and  $d_{ctDNA}$ ) and (ii) the parameters ( $d$ , and  $d_{pDNA}$  or  $d_{ctDNA}$ ) decrease slightly versus  $\alpha$  in a similar trend.

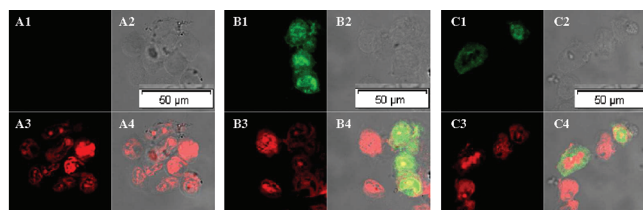
To confirm the viability of lipoplexes with such a low CL quantity ( $\rho_{eff} \geq 1$  using  $q_{pDNA}^- = -0.4$ , instead of the  $\rho_{est} \ll 1$  assuming  $q_{pDNA}^- = -2$ , as erroneously done in literature), transfection and cytotoxicity assays were also performed under the same conditions using HEK293T cells. Figure 4 shows the transfection efficiency (% green fluorescence protein (GFP) cells, and mean fluorescence intensity (MFI)) for the  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplex at  $\alpha = 0.5$ , covering the range  $0.25 < \rho_{eff} < 4$  (with  $q_{pDNA}^- = -0.4$ ) or  $0.0625 < \rho_{est} < 1$  (if  $q_{pDNA}^-$  was  $-2$ ). See SI Figure S-9 for results obtained for transfection with other cell lines. Notice that  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE is a better transfecting agent than Lipofectamine2000 in the case of HEK293T, H460, and CHO. As pointed out previously, in order for transfection to occur, the lipoplex has to be positively charged, i.e., at  $\rho_{eff} \geq 1$ , which is exactly what is observed in Figure 4 only if  $q_{pDNA}^- = -0.4$ , and not with  $q_{pDNA}^- = -2$ , which would yield a  $\rho_{est} \geq 0.25$ .

The findings shown in Figure 4 are corroborated further by the pDNA internalization seen using confocal fluorescence microscopy. For the  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplex at  $\alpha = 0.5$ , and  $\rho_{eff} = 2$ , there is even more effective GFP expression, in the presence of serum,<sup>31</sup> as is evident in Figure 5.

Cytotoxicity of CL-pDNA lipoplexes at several CL compositions and at two charge ratios,  $\rho_{eff} = 2$  and 4, with  $q_{pDNA}^- = -0.4$ , that are equivalent to  $\rho_{est} = 0.5$  and 1, with  $q_{pDNA}^- = -2$ , are shown in SI Figure S-10. Note that the cell viability is close to 100%, pointing to a negligible cytotoxicity due to the low amount of CL used as vector to achieve high transfection efficiency.

Electrophoresis on 1% agarose gel SI indicates that, at  $\rho_{eff} = 2$ , irrespective of the molar fraction of CL in the bilayer ( $\alpha$ ), the pDNA is fully protected by CL after the lipoplex formation (see





**Figure 5.** Confocal fluorescence microscopy of HEK293T cells using  $C_{16}C_{2}C_{16}/DOPE$ –pDNA at  $\alpha = 0.5$  and  $\rho_{\text{eff}} = 2$ . (A1–A4) Negative control (cells only); cells incubated with the same lipoplex at  $\alpha = 0.5$  and  $\rho_{\text{eff}} = 2$  with (B1–B4) and without (C1–C4) serum. A1, B1, and C1 show the GFP in the cell, and A2, B2, and C2 show the phase contrast of the cells. A3, B3, and C3 show propidium iodide stain, and A4, B4, and C4 are overlaps of panels 1 and 3 in each case. Red, propidium iodide; green, GFP.

SI Figures S-11 and S-12). Thus, complexes with different membrane charge density and charge ratio but with similar lipid surface area should exhibit comparable DNA binding capacity. This could be due to a size-dependent effect owing to the reduced surface area occupied by the supercoiled DNA with respect to the linear one. As  $\zeta$  potential measurements show that a much less effective quantity of CLs is required to neutralize the pDNA charges, it may be reasonable to assume that part of the  $\text{Na}^+$  counterions remain bound to pDNA. The data reported herein are in agreement with the reported role of surface area of CL membranes in controlling the 2D DNA condensation.<sup>28,32</sup> Thus the spatial dimension available plays a key role in the DNA binding ability of the lipoplexes. A complete DNA protection is absolutely necessary for efficient transfection. However, the use of an excess amount of CL is harmful in terms of toxicity to the cells. Thus our results seem to offer a practical strategy for transfection studies, i.e., employing lipoplex formulations that guarantee full DNA protection with the minimum amount of CL.

To our knowledge, this is the first report that experimentally demonstrates why plasmid DNA, with a lower effective negative charge, is much more efficiently transfected than linear DNA using cationic lipids as vectors in gene therapy. It has been shown that, for different types of CLs irrespective of their differences in molecular architectures, pDNA is compacted, retaining a significant number of counterions in its vicinity. This in turn drives to a lower effective negative charge, and therefore a lower amount of CL is needed. This finding is significant for both *in vitro* and *in vivo* transfection studies, because for an effective DNA transfection, the lower the amount of the CL, the lower is the cytotoxicity. The study also points out why it is necessary to work with both effective charge ratios and effective pDNA charges which can be determined from the physicochemical experiments, as reported herein. An extended study including more CLs in the whole composition and different  $\rho_{\text{eff}}$  is currently in progress.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

**S Supporting Information.** Materials, methods, and additional results. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

sb@orgchem.iisc.ernet.in; aicart@quim.ucm.es

### Author Contributions

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

## ■ ACKNOWLEDGMENT

The authors thank MICINN of Spain (CTQ2009-10002BQU and AIC2009-0867), DST, Govt. of India for JC Bose fellowship to S.B. (DST/INT/SPAIN/P-8/2009), UCM (A05-33-010 and GR58-08), a BM16-CRG/Consorti Laboratori Llum Sincrotró at ESRF, Grenoble, France, F. Fauth for assistance with SAXS studies, and S. Datta and I. Rodriguez-Crespo for synthesis of gemini CL and for pDNA purification, respectively.

## ■ REFERENCES

- (1) Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Science* **1997**, *275*, 810.
- (2) Verma, I. M.; Weitzman, M. D. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 711.
- (3) Koynova, R.; MacDonald, R. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*.
- (4) Montier, T.; Benvegnu, T.; Jaffres, P. A.; Yaouanc, J. J.; Lehn, P. *Curr. Gene Ther.* **2008**, *8*, 296.
- (5) Wasungu, L.; Hoekstra, D. J. *Controlled Release* **2006**, *116*, 255.
- (6) Dias, R. S.; Lindman, B. *DNA Interaction with Polymers and Surfactants*; Wiley & Sons: Hoboken, 2008.
- (7) Bhattacharya, S.; Bajaj, A. *Chem. Commun.* **2009**, 4632.
- (8) Shirazi, R. S.; Ewert, K. K.; Leal, C.; Majzoub, R. N.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1808.
- (9) Caracciolo, G.; Marchini, C.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Amenitsch, H.; Montani, M.; Amici, A. *Langmuir* **2007**, *23*, 4498.
- (10) Rodriguez-Pulido, A.; Martin-Molina, A.; Rodriguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648.
- (11) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7764.
- (12) Ewert, K.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Lin, A. J.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 133.
- (13) Tiera, M. J.; Shi, Q.; Winnik, F. M.; Fernandes, J. C. *Curr. Gene Ther.* **2011**, *11*, 288.
- (14) Eisele, K.; Gropeanu, R. A.; Zehendner, C. M.; Rouhanipour, A.; Ramanathan, A.; Mihov, G.; Koynov, K.; Kuhlmann, C. R. W.; Vasudevan, S. G.; Luhmann, H. J.; Weil, T. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8789.
- (15) Mustapa, M. F. M.; Grosse, S. M.; Kudsiova, L.; Elbs, M.; Raiber, E. A.; Wong, J. B.; Brain, A. P. R.; Armer, H. E. J.; Warley, A.; Keppler, M.; Ng, T.; Lawrence, M. J.; Hart, S. L.; Hailes, H. C.; Tabor, A. B. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 51.
- (16) Chen, J.; Tian, B.; Yin, X.; Zhang, Y. P.; Hu, D.; Hu, Z.; Liu, M.; Pan, Y.; Zhao, J.; Li, H.; Hou, C.; Wang, J.; Zhang, Y. P. *J. Biotechnol.* **2007**, *130*, 107.
- (17) Mahato, R. I.; Kim, S. W. *Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid-Base Therapeutics*; Taylor & Francis: London, 2002.
- (18) Loney, C.; Vandenbranden, M.; Ruysschaert, J. M. *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 340.
- (19) Ma, B. C.; Zhang, S. B.; Jiang, H. M.; Zhao, B. D.; Lv, H. T. *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 184.
- (20) Manning, G. S. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 924.
- (21) Cherng, J. Y.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; Jiskoot, W.; Talsma, H.; Zuidam, N. J.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A. *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 343.
- (22) von Groll, A.; Levin, Y.; Barbosa, M. C.; Ravazzolo, A. P. *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 1220.
- (23) Chancham, P.; Hughes, J. A. *J. Liposome Res.* **2001**, *11*, 139.
- (24) Muñoz-Ubeda, M.; Rodriguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Martin-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Soft Matter* **2011**, 5991.
- (25) Farago, O.; Gronbeck-Jensen, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2875.
- (26) Farago, O.; Gronbeck-Jensen, N. *Soft Matter* **2011**, *7*, 4302.
- (27) Muñoz-Ubeda, M.; Rodriguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Martin-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3332.
- (28) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Amici, A.; Amenitsch, H. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 2028.
- (29) Farago, O.; Ewert, K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Gronbeck-Jensen, N.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 836.
- (30) Zidovska, A.; Evans, H. M.; Ewert, K. K.; Quispe, J.; Carragher, B.; Potter, C. S.; Safinya, C. R. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 3694.
- (31) Bajaj, A.; Kondiah, P.; Bhattacharya, S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2432.
- (32) Marchini, C.; Montani, M.; Amici, A.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Caracciolo, G. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *94*, 033903.

## Supporting Information for

### Why Is Less Cationic Lipid Required To Prepare Lipoplexes from Plasmid DNA Than Linear DNA in Gene Therapy?

Mónica Muñoz-Úbeda,<sup>‡,¶</sup> Santosh K. Misra,<sup>§,¶</sup> Ana L. Barrán-Berdón,<sup>‡</sup> Clara Aicart-Ramos,<sup>†</sup> María B. Sierra,<sup>‡</sup> Joydeep Biswas,<sup>§</sup> Paturu Kondaiah,<sup>#</sup> Elena Junquera,<sup>‡</sup> Santanu Bhattacharya,<sup>\*,§</sup> and Emilio Aicart<sup>\*,‡</sup>

<sup>‡</sup>Grupo Química Coloidal y Supramolecular, Dpto. Química Física I, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>§</sup>Dept. Organic Chemistry, Indian Institute of Science, 560012 Bangalore, India

<sup>†</sup>Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>#</sup>Dept. Molecular Reproduction Development and Genetics, Indian Institute of Science, 560012 Bangalore, India

<sup>¶</sup>These authors contributed equally to this work

\*Authors to whom the correspondence should be addressed:

Emilio Aicart: Fax: +34913944135. e-mail: [aicart@quim.ucm.es](mailto:aicart@quim.ucm.es)

Santanu Bhattacharya: Fax: +918023600529. e-mail: [sb@orgchem.iisc.ernet.in](mailto:sb@orgchem.iisc.ernet.in)



## Experimental Section.

**Materials.** All reagents and solvents used in the present study were of highest grade commercially available and all are used purified, dried, or freshly distilled, as required.

**Lipids.** The cationic gemini surfactant 1, 2-bis(hexadecyldimethylammonium)ethane referred to as  $C_{16}C_2C_{16}$  was synthesized according to a reported procedure.<sup>1</sup> Briefly, *N,N,N',N'*-tetramethylenediamine (20 mmol, 3.01 ml) and an excess of *n*-hexadecyl bromide (20 g) were heated in ethanol under reflux until the diamine was consumed (~48 h). After removal of the solvent by evaporation, the crude solid residue was recrystallized twice in dry acetone. The resulting product was dissolved in minimum volume of a mixture of hexane/ethyl acetate for at least three times to eliminate the excess of *n*-hexadecyl bromide. This material was adjudged pure by TLC and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and elemental analysis. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm downfield from the internal standard (TMS) and the pertinent details are given below: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.87 (t, 6H, alkyl chain 2  $\times$  CH<sub>3</sub>), 1.24-1.40 (br m, 52H, alkyl chain 2  $\times$  13 CH<sub>2</sub>), 1.75 (br s, 4H, alkyl chain 2  $\times$  CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>), 2.64 (br s, 2H, spacer chain 1  $\times$  CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>), 3.51 (s, 12H, 2  $\times$  2 N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 3.68 - 3.72 (m, 4H, alkyl chain 2  $\times$  CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>), 4.81 (s, 4H, spacer chain 2  $\times$  CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>). Anal. Calcd. for C<sub>38</sub>H<sub>82</sub>N<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>, 2.0 H<sub>2</sub>O: C, 59.83; H, 11.36; N, 3.67. Found C, 60.12; H, 11.48; N, 3.43.

Cationic lipids, 1, 2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine chloride (DOEPC), 3 $\beta$ -[*N*-(*N,N*-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride (DC-Chol), and the zwitterionic lipid, 1, 2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE), with the best purities, were purchased from Avanti Polar Lipids.

**Plasmid DNA and Calf Thymus DNA.** Competent *E. coli* DH5 $\alpha$  cells were transformed with the plasmid pEGFP-C3. A starter culture of 10 ml LB (Luria Broth) medium in the presence of 100  $\mu$ g/ml kanamycin, was inoculated with a single colony

from a freshly streaked plate and incubated overnight at 37 °C while shaking at 230-245 rpm . The overnight culture of 10 ml was used to inoculate 50 ml of LB with 100  $\mu$ g/ml kanamycin and the new culture was grown at 37 °C while shaking for 9 h. This culture of 60 ml was used to inoculate each of two 2 L flasks containing 1 L of LB medium in the presence of 100  $\mu$ g/ml kanamycin. The cultures were grown at 37 °C at a rotation rate of 230-245 rpm for 15-18 h before the cells were harvested by centrifugation at 7000 rpm, at 4 °C for 15 minutes in an F10S rotor (Sorvall, Norwalk, USA). The wet bacterial pellet was frozen in plastic bags as thin films and stored at -20 °C until the Gigaprep was carried out (2 L of LB medium for each Gigaprep). The plasmid purification was performed using the GenElute HP Select Plasmid Gigaprep Kit (Sigma-Aldrich). The recovered plasmid DNA (pDNA) was predominantly in its supercoiled conformation as determined from ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis. The recovery and purity of the pDNA (4.7 kb) was determined by a spectrophotometric analysis. The recovered eluate from each five Gigapreps was lyophilized since a more concentrated plasmid preparation in HEPES was desired.

Linear DNA used was the sodium salt of calf thymus DNA (ctDNA) provided by Sigma-Aldrich. It contains 2700 base pairs per fragment on average, as determined from agarose gel electrophoresis.

**Preparation of Lipid Mixtures and Lipoplexes.** A protocol widely explained elsewhere was used for the preparation of mixed lipids (including a sequential extrusion procedure that gives unilamellar liposomes with 100 nm diameter on average) and lipoplex solutions.<sup>2</sup> A stock solution of DNA was prepared two days before the mixing with lipids. DNA concentrations (expressed in mM base pairs) were determined by absorbance at 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}$ ).<sup>3,4</sup>

**Zeta Potential.** The Phase Analysis Light Scattering technique (*Zeta PALS*, Brookhaven Instrum. Corp., USA) was used to measure electrophoretic mobilities (and from it, zeta potential)<sup>5,6</sup> This interferometric technique uses phase analysis light scattering to determine the electrophoretic mobility of the charged colloidal suspensions. Each electrophoretic mobility datum is taken as an average over 50 independent measurements. Solutions were prepared with distilled and deionized water buffered with HEPES buffer at physiological conditions (pH = 7.4). Electrophoretic mobility for liposome and lipoplex solutions was measured, at each cationic lipid composition ( $\alpha$ ) (cationic to neutral lipid ratios of the mixed liposome), as a function of lipoplex composition ( $L/D$ ) (lipid to DNA mass ratios). In all the cases, zeta potential ( $\zeta$ ) has been obtained from electrophoretic mobility ( $\mu_e$ ) by using the well known Henry equation:

$$\zeta = \frac{3\eta}{2\varepsilon_0\varepsilon_r f(\kappa_D a)} \mu_e \quad (1)$$

where  $\eta$  is the viscosity of water ( $8.904 \times 10^{-4}$  N m<sup>-2</sup> s at 298.15 K);  $\varepsilon_0$  and  $\varepsilon_r$  are the vacuum and relative permittivity ( $8.854 \times 10^{-12}$  J<sup>-1</sup> C<sup>2</sup> m<sup>-1</sup> and 78.5), respectively; and  $f(\kappa_D a)$  the Henry function, that depends on the reciprocal Debye length ( $\kappa_D$ ) and the hydrodynamic particle radius ( $a$ ). For medium-to-large particles in a medium of moderate ionic strength ( $a \gg \kappa_D^{-1}$ ), Smoluchowski limit is usually applied ( $f(\kappa_D a) = 1.5$ ) to estimate the Henry function.<sup>7,8</sup>

**GelRed Fluorescence Assay.** Fluorescence emission spectra of GelRed probe in the 530-700 nm region were recorded with excitation at 520 nm (the molar extinction coefficient is the same at 520 nm for free and pDNA-associated GelRed) by using a Perkin Elmer LS-50B luminescence spectrometer.<sup>9</sup> A 10 mm stoppered rectangular silica cell was placed in a stirred cuvette holder whose temperature was kept constant at

298.15  $\pm$  0.01 K. Probe concentration of GelRed (150X) and pDNA concentration (0.25 mg/mL) were kept constant in all the cases. The emission of a GelRed/pDNA solution was registered at increasing liposome concentrations by adding a GelRed/pDNA/liposome solution, thus covering a wide range of lipoplex compositions. Blank tests were done by measuring GelRed emission in the medium and in the presence of the liposomes alone. These experiments were carried out at several cationic lipid compositions ( $\alpha$ ). In all the cases, the excitation and emission band slits were fixed at 2.5 and 5 nm, respectively, and scan rate was selected at 240 nm/min. Solutions were prepared with distilled and deionized water buffered with HEPES buffer at physiological conditions (pH = 7.4).

**Gel Electrophoresis.** Lipoplexes along with the un-complexed plasmid DNA were loaded on to 1% agarose gel and ran for 30 min at 100 mV in 1x TAE (Tris-HCl, Acetate and EDTA) buffer. The amount of DNA (free and complexed) was retained same as 200 ng per well for all the samples. Then, gels were photographed under UV exposure at 365 nm for 300 ms. Fully positively charged lipoplexes appeared as bands in the wells of the gel while the uncomplexed, free DNA appeared outside the well as fluorescent bands. The amount of liposome required to produce neutral lipoplex was defined as the DNA binding efficiency of the particular liposome. Fluorescent band intensity was measured using a commercial Alfa-digi-Doc software provided with Gel-Doc instrument (UV-pro-Platinum). The band intensity for free DNA was considered as 100 % and the other intensities were calculated accordingly from the densitograms.

**SAXS Experiments.** Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were carried out on the Beamline 16 at European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) Grenoble

(France). The energy of the incident beam was 12.6 KeV ( $\lambda = 0.995 \text{ \AA}$ ). Samples were placed in sealed glass capillaries purchased from Hilgenberg with an outside diameter of 1.5 mm and wall thickness of 0.01 mm. The scattered X-ray is detected on [MARCCD 165](#) (2048x2048 pixels highest achievable resolution - pixel size 78 microns), converted to one-dimensional scattering by radial averaging, and represented as a function of momentum transfer vector  $q$  ( $= 4\pi\sin\theta/\lambda$ ), in which  $\theta$  is half the scattering angle and  $\lambda$  is the wavelength of the incident X-ray beam. The sample to detector distance was 1.4 m. Measurements on each sample were collected over 5 to 20 s each. SAXS experiments were run at different cationic lipid compositions ( $\alpha$ ) for lipoplexes formed with pDNA. Solutions were prepared with deionized water buffered with HEPES at pH = 7.4.

**Transfection Efficiency.** Transfection experiments of pEGFP-C3 on HEK293T cells using mixed lipids C<sub>16</sub>C<sub>2</sub>C<sub>16</sub>/DOPE were performed in absence and in presence of serum. Lipoplexes were prepared using 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of plasmid DNA (pDNA) diluted with plain DMEM (Sigma-Aldrich). The amount of mixed lipids was added to 0.8  $\mu\text{g}$  of pDNA in such a way that it gave the desired charge ratio ( $\rho$ ). The volume of the mixture was made up to 100  $\mu\text{L}$  with plain DMEM and mildly spun down to settle down the whole lipoplex to the bottom of a centrifuge tube. After 30 min incubation at room temperature, the lipoplex suspension was further diluted with 100  $\mu\text{L}$  of 20 % FBS containing DMEM. Those 200  $\mu\text{L}$  of lipoplex suspensions with 10 % FBS containing DMEM were added to one well of 24 well plates plated with 60000 cells, which were washed with plain DMEM. Experiment was performed in duplicate and repeated twice independently for each  $\rho$ . After 6 h of incubation at 37 °C and 99 % humidity with regular supply of 5 % CO<sub>2</sub>, old medium was removed from the wells. Cells were washed with plain DMEM and further 500  $\mu\text{L}$  10 % FBS containing DMEM

were added to the cells. Cells were further incubated for ~48 h in the above mentioned conditions. At the end of incubation, cells were washed with 200  $\mu$ L DPBS and harvested and collected in 200  $\mu$ L/well of 5 % FBS containing DPBS after trypsinization with 1 x trypsin (Sigma-Aldrich). Collected cells were carried for Flow Assisted Cell Sorting (FACS). Cells were passed through laser filter 488 nm, which provides the data for number of cells with higher green fluorescence (% GFP cells), compared to the residual fluorescence of the cells as well as average intensity of fluorescence per cell (Mean Fluorescence Intensity (MFI)).

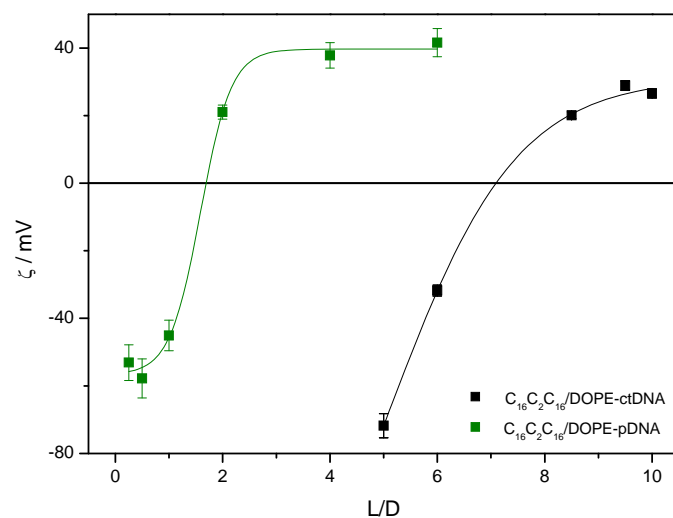
Data were analyzed by using public domain software WinMDI 2.8. Results were plotted as % GFP cells and MFI against charge ratio ( $\rho$ ) on Graph pad prism 5.0 software. Lipofectamine2000 was used as positive control during all the transfection experiments.

**Cell Viability/Toxicity Assay.** Cytotoxicity of each lipid formulation toward HEK293T cells was determined using 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay (MTT assay) following literature procedure.<sup>10,11</sup> Nearly 15000 cells were plated in 96-well plates (Nunc, Denmark) and grown till ~70 % confluence. Lipoplexes were prepared using 0.2  $\mu$ g of pDNA per well at various  $\rho$  charge ratios. Lipoplexes were incubated with cells for 6 h. Cells were washed and re-incubated with 10% FBS containing growth medium. After 42 h, 20  $\mu$ L of MTT were added to each well and the mixtures were further incubated for 4-5 h. Blue formazan crystals were seen when checked under microscope. Media were removed and 200  $\mu$ L of DMSO were added per well and kept on flat rocker for 10 min to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured using a microtiter plate reader. The % cell viability was then calculated from readings obtained from ELISA reader using equation:

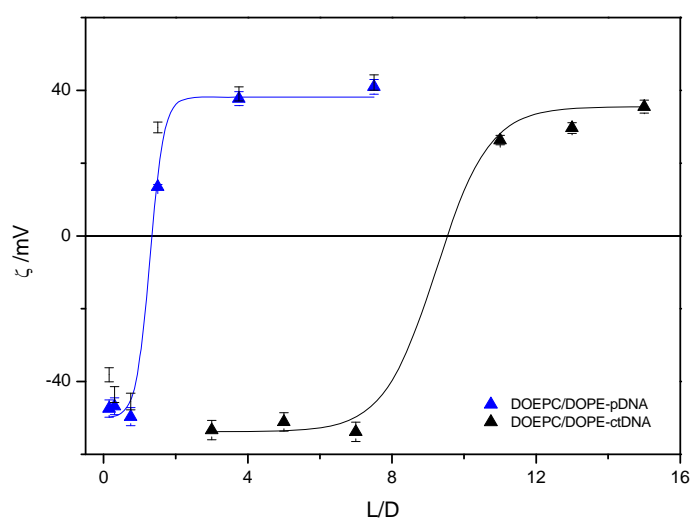
$$\% \text{ Viability} = \frac{A_{590, \text{treated cells}} - A_{590, \text{background}}}{A_{590, \text{untreated cells}} - A_{590, \text{background}}} \times 100 \quad (2)$$

**Confocal Fluorescence Microscopy.** Confocal microscopic studies were performed on pEGFP-c3 transfected to HEK293T cells, exactly in the same way as transfection experiments. Cells, plated on glass slips placed in well of 12-well plates, were grown till cell-monolayer gained ~80 % confluence. The experiments were performed using 0.8 µg DNA per well. Working stocks of lipoplexes were prepared in DMEM with (-FBS+FBS) and without (-FBS-FBS) serum by conventional method. Cells were treated with these lipoplexes for 6h followed by 42 h of incubation in presence of 10 % FBS containing DMEM. Control experiments were performed in each case by using commercially available transfection reagent, Lipofecatamine2000, using a standard protocol specified by the manufacturers, in the absence (-FBS-FBS) and in the presence (-FBS+FBS) of serum. After 42 h of incubation, the entire medium was removed from the wells and cells were washed properly with DPBS buffer and all the cell debris were carefully removed without disturbing the monolayer of cells. Cells were fixed for 10 min by using 1 ml of 4 % paraformaldehyde each well, washed with DPBS for 3x10 min and then incubated with 1 ml of 0.1 % Triton X-100 for 5 min to increase the membrane permeabilization. Cells were washed with DPBS for 3x10 min. Then glass slips were fixed and the permeabilized monolayers of HEK293T cells were taken out from the wells, kept on glass slides and incubated for 5 min with 1 µg/ml of propidium iodide (PI) to specifically stain the nucleus of the cells. Further cells were washed with DPBS for 3x10 min to remove extra PI and to reduce over-staining. Then vector shield was used to mount the cell possessing glass slips on glass slides. Samples were finally observed under confocal microscope.

**Supplementary Figures.**

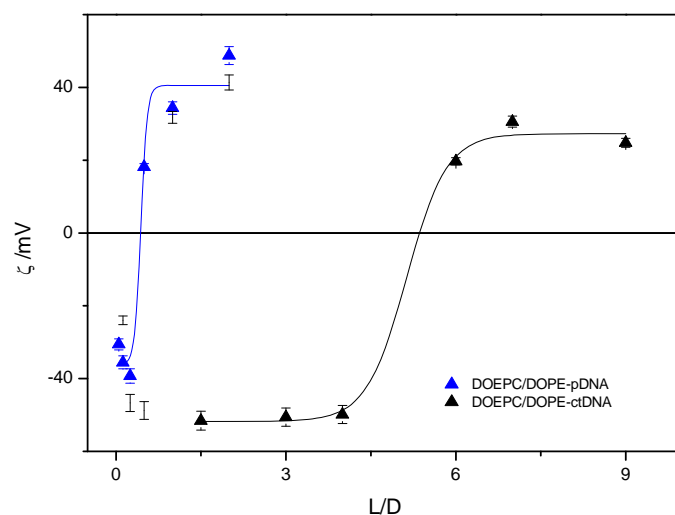


**Figure S-1.** Plot of zeta potential ( $\zeta$ ) against lipoplex composition ( $L/D$ ) for  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -ctDNA and  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA at  $\alpha = 0.15$  in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4. Errors are within  $\pm 5\%$ , [DNA] = 0.1 mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on the CL composition, to cover a wide  $L/D$  range.

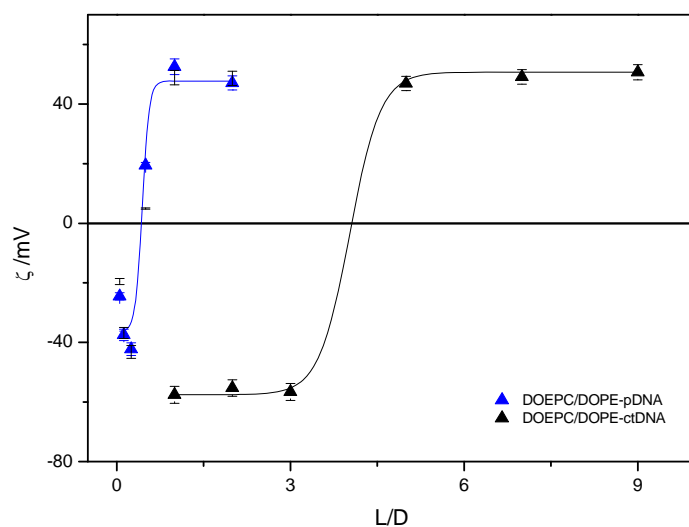


**Figure S-2.** Plot of zeta potential ( $\zeta$ ) against of lipoplex composition ( $L/D$ ) for DOEPC/DOPE-ctDNA and DOEPC/DOPE-pDNA at  $\alpha = 0.25$  in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4. Errors are within  $\pm 5\%$ , [DNA] = 0.1 mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on the CL composition, to cover a wide  $L/D$  range.

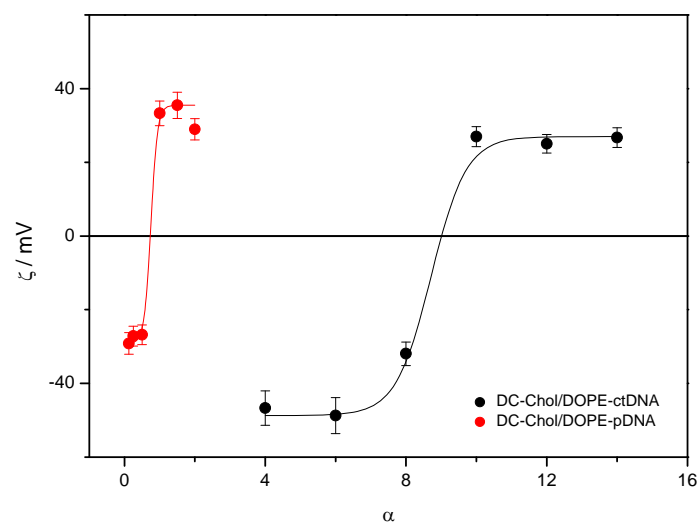




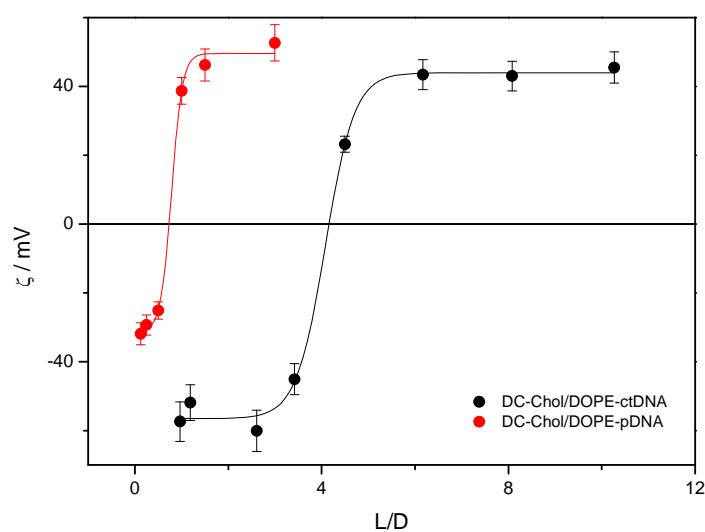
**Figure S-3.** Plot of zeta potential ( $\zeta$ ) against lipoplex composition ( $L/D$ ) for DOEPC/DOPE-ctDNA and DOEPC/DOPE-pDNA with  $\alpha = 0.50$  in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4. Errors are within  $\pm 5\%$ , [DNA] = 0.1 mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on the CL composition, to cover a wide  $L/D$  ratio range.



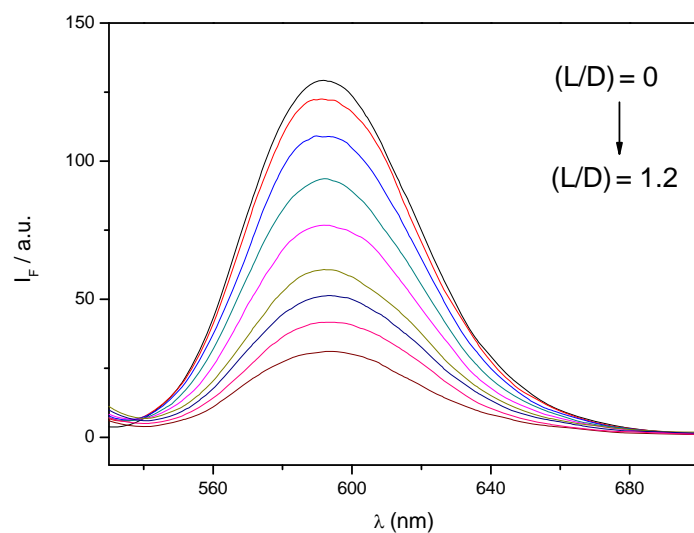
**Figure S-4.** Plot of zeta potential ( $\zeta$ ) against lipoplex composition ( $L/D$ ) for DOEPC/DOPE-ctDNA and DOEPC/DOPE-pDNA lipoplexes at  $\alpha = 0.75$  in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4. Errors are within  $\pm 5\%$ , [DNA] = 0.1 mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on the CL composition, to cover a wide  $L/D$  range.



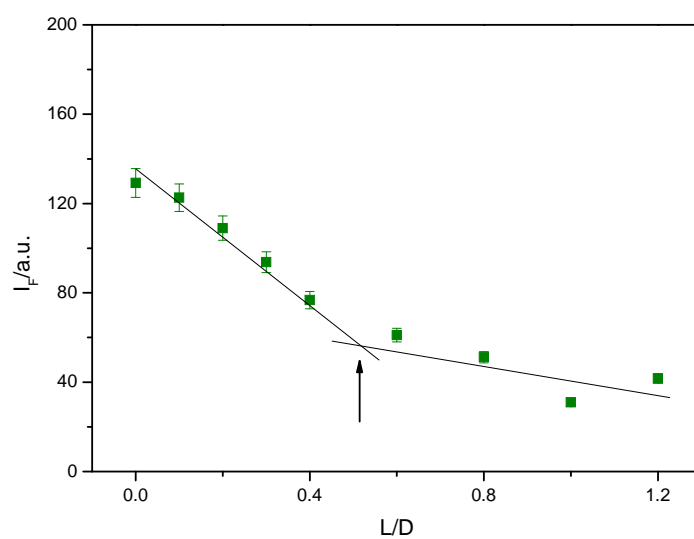
**Figure S-5.** Plot of zeta potential ( $\zeta$ ) against lipoplex composition ( $L/D$ ) for DC-Chol/DOPE-ctDNA and DC-Chol/DOPE-pDNA at  $\alpha = 0.25$  in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4. Errors are within  $\pm 5$  %, [DNA] = 0.1 mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on the CL composition, to cover a wide  $L/D$  range.



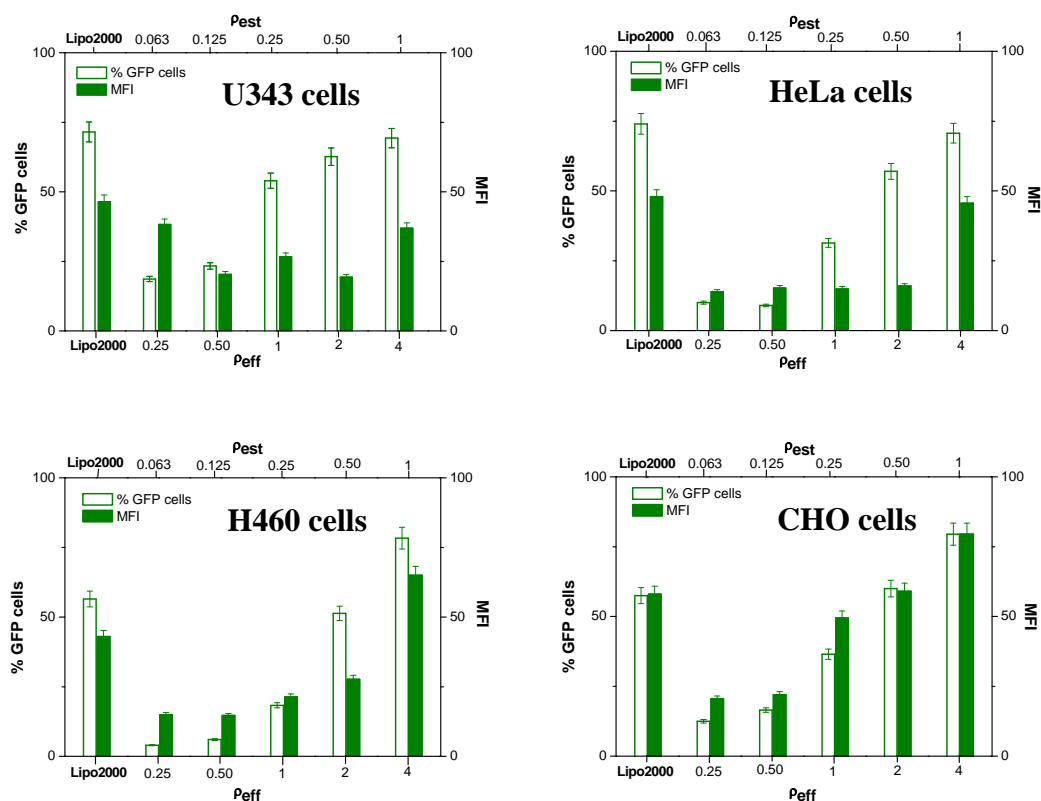
**Figure S-6.** Plot of zeta potential ( $\zeta$ ) against lipoplex composition ( $L/D$ ) for DC-Chol/DOPE-ctDNA and DC-Chol/DOPE-pDNA lipoplexes at  $\alpha = 0.50$  in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4. Errors are within  $\pm 5$  %, [DNA] = 0.1 mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on the CL composition, to cover a wide  $L/D$  range.



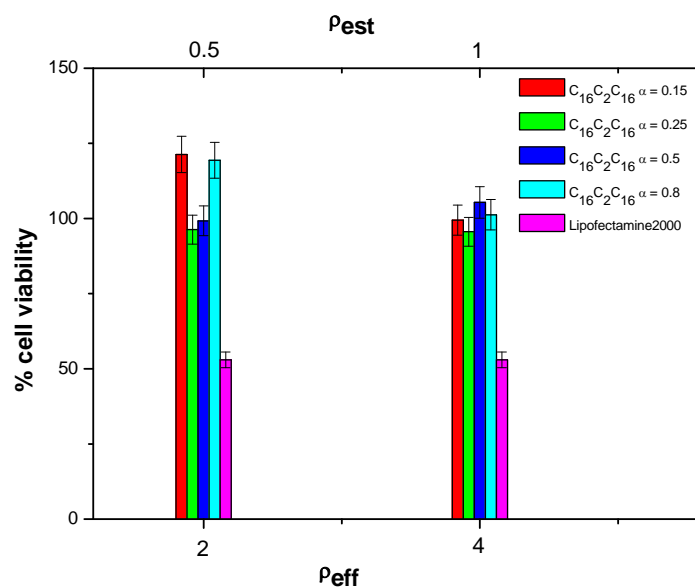
**Figure S-7.** Emission fluorescence spectra of GelRed in the presence of  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes at  $\alpha = 0.5$  and different  $L/D$  ratios from 0 to 1.2. HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4,  $C_{16}C_2C_{16}$ :DOPE ratio is 1:1 and [pDNA] = 0.25 mg/mL.



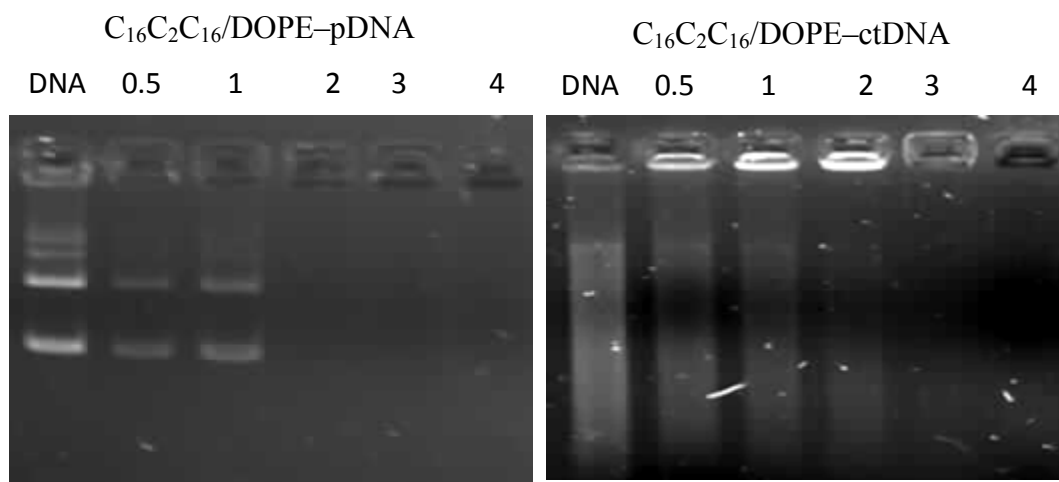
**Figure S-8.** Fluorescence emission intensity of GelRed at 592 nm in the presence of  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes against  $L/D$  ratio at  $\alpha = 0.5$ , in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4 and [pDNA] = 1 mg/mL.



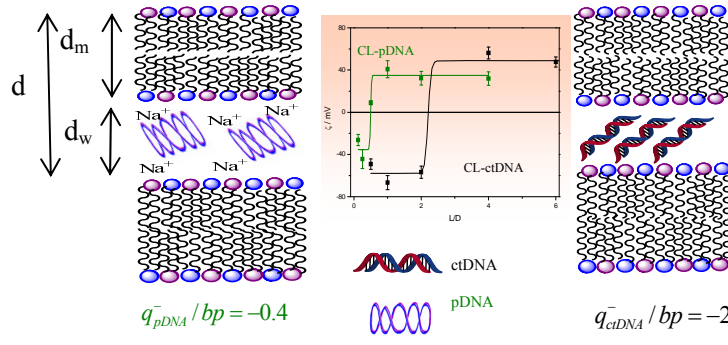
**Figure S-9.** Transfection efficiency (% GFP cells and MFI) of  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pEGFP-C3 plasmid DNA at CL composition  $\alpha = 0.5$  for four cell lines. Also included are the results for Lipofectamine2000-pEGFP-C3 plasmid DNA, as a control.



**Figure S-10.** Cytotoxicity assay (MTT) of  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ –pEGFP- $C_3$  plasmid DNA at several CL composition ( $\alpha$ ) and at two charge ratios,  $\rho_{eff} = 2$  and 4.



**Figure S-11.** DNA binding of  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$  ( $\alpha = 0.5$ ) at different  $\rho_{eff}$ . Experiment was performed using 200 ng of either pDNA (left) or ctDNA (right). Numbers above each well show  $C_{16}C_2C_{16}/DNA$  charge ratios whereas DNA represents the free DNA alone.



**Chart S-1.** Lamellar structure of the CL/DOPE-DNA lipoplexes.

**Deduction of Eq 3 of the MS.**  $L/D$  ratio and its value at the electroneutrality,  $(L/D)_\phi$ , are defined as mass ratios, as stated in the manuscript. Equation 3 is obtained from eq 2 (after eliminating  $D$ ) and the definition of  $L/D$  ratio, as follows:

$$\left(\frac{L}{D}\right)_\phi = \left(\frac{L^+ + L^0}{D}\right)_\phi \quad (3)$$

$$CR = \rho = \frac{n_+}{n_-} = \frac{q_{L^+}^+}{q_{DNA}^-} \frac{L^+ / M_{L^+}}{D / M_{bp}} \quad (4)$$

At  $\rho=1$ , the mass of DNA ( $D$ ) can be expressed as:

$$D = \frac{q_{L^+}^+}{q_{DNA}^-} \frac{L^+ / M_{L^+}}{1 / M_{bp}} \quad (5)$$

When introduced in the  $(L/D)_\phi$  this is given by:

$$\left(\frac{L}{D}\right)_\phi = \frac{(L^+ + L^0)}{\frac{q_{L^+}^+}{q_{DNA}^-} \frac{L^+ / M_{L^+}}{1 / M_{bp}}} = \frac{q_{DNA}^-}{q_{L^+}^+} \frac{M_{L^+}}{M_{bp}} \left(\frac{L^+ + L^0}{L^+}\right) = \frac{q_{DNA}^-}{q_{L^+}^+} \frac{M_{L^+}}{M_{bp}} \frac{(n^+ M_{L^+} + n^0 M_{L^0})}{n^+ M_{L^+}} \quad (6)$$

After multiplying by  $\left[\frac{(n^+ + n^0)}{(n^+ + n^0)}\right]$ , and introducing the CL composition ( $\alpha$ ),

we get the eq 3 of the manuscript:

$$\left(\frac{L}{D}\right)_\phi = \frac{q_{DNA}^-}{q_{L^+}^+} \frac{1}{M_{bp}} \frac{(n^+ M_{L^+} + n^0 M_{L^0})}{(n^+ + n^0)} \frac{1}{n^+ / (n^+ + n^0)} = \frac{q_{DNA}^-}{q_{L^+}^+} \frac{1}{M_{bp}} \frac{(\alpha M_{L^+} + (1-\alpha) M_{L^0})}{\alpha} \quad (7)$$

## REFERENCES

- (1) De, S.; Aswal, V. K.; Goyal, P. S.; Bhattacharya, S. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 11664.
- (2) Rodriguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Llorca, O.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2187.
- (3) Barreleiro, P. C. A.; Lindman, B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6208.
- (4) Mel'nikov, S. M.; Lindman, B. *Langmuir* **1999**, *15*, 1923.
- (5) Muñoz-Ubeda, M.; Rodriguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Martin-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3332.
- (6) Rodriguez-Pulido, A.; Martin-Molina, A.; Rodriguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648.
- (7) Delgado, A. V. *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*. Marcel Dekker: New York, 2002; Vol. 106.
- (8) Ohshima, H.; Furusawa, K. *Electrical Phenomena at Interfaces. Fundamentals, Measurements, and Applications*. Marcel Dekker: New York, 1998.
- (9) Junquera, E.; del Burgo, P.; Boskovic, J.; Aicart, E. *Langmuir* **2005**, *21*, 7143.
- (10) Hansen, M. B.; Nielsen, S. E.; Berg, K. *J. Immunol. Methods* **1989**, *119*, 203.
- (11) Bajaj, A.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1537.

#### **Art.4. How Does Spacer Length of Cationic Gemini Lipids Influence the Lipoplex Formation with Plasmid DNA? Physicochemical and Biochemical Characterizations and Their Relevance in Gene Therapy**

M. Muñoz-Úbeda; S. K. Misra; A. L. Barrán-Berdón; S. Datta; C. Aicart-Ramos; P. Castro-Hartmann; P. Kondaiah; E. Junquera; S. Bhattacharya; E. Aicart

*Biomacromolecules* **2012**, 13, 3926-3937

En esta publicación se han estudiado cuatro lipoplejos ( $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-pDNA$ ) formados por el plásmido pEGFP-C3 DNA (pDNA) y los liposomas mixtos constituidos por un lípido catiónico gemini de la familia  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n$ , donde  $n = 2, 3, 5$  ó  $12$ , y el lípido zwitteriónico DOPE, a diferentes fracciones molares del lípido catiónico,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, y a diferentes relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , entre el lípido catiónico y el pDNA. Con los resultados obtenidos en esta publicación se completa la caracterización de la serie de lipoplejos constituidos por la familia de lípidos gemini  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n$ , iniciada en el artículo anterior, donde solo se había estudiado parcialmente el lipoplejo con CL de espaciador más corto ( $n = 2$ ) de la serie. Así, se han evaluado otras longitudes (mayores) del espaciador y para el lipoplejo con el lípido gemini de espaciador más corto, el estudio se ha extendido a un mayor número de fracciones molares,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, a bastantes más relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , entre el lípido catiónico y el pDNA, y utilizando alguna técnica biofísica adicional.

El estudio comprende dos enfoques, biofísico y bioquímico, y se ha realizado con la ayuda de una amplia gama de técnicas experimentales. Los métodos biofísicos se resumen en: a) la movilidad electroforética o potencial zeta,  $\zeta$ , y b) la electroforesis en gel de agarosa, para determinar las cargas efectivas del lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , y del plásmido DNA,  $q_{pDNA}^-$ , la relación de masas lípido/DNA en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$  y el tipo de interacción que existe entre el liposoma mixto y el pDNA, c) la dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) para determinar el tipo de estructura y, d) la crio-microscopía electrónica de transmisión (crio-TEM), para determinar el tamaño, forma y morfología de los liposomas mixtos y lipoplejos. Los métodos bioquímicos realizados para determinar la potencial viabilidad de los lipoplejos caracterizados se han basado en: i) la citometría de flujo (FACS) y la microscopía confocal de fluorescencia, para determinar cuantitativamente la eficiencia en la transfección mediante esta terapia génica y, ii) la



viabilidad celular/citotoxicidad (ensayo de reducción de MTT), para determinar la toxicidad que causan estos lipoplejos a las células.

Los resultados obtenidos indican que todos los lípidos catiónicos utilizados poseen, independientemente de la longitud del espaciador, una carga positiva efectiva que coincide con su valor nominal (+2). Pero lo que es más importante, el estudio ha corroborado que el plásmido DNA superenrollado posee una carga negativa efectiva menor que su carga nominal ( $q_{pDNA}^- \ll |-2|$  por par de bases), de modo que los lipoplejos apropiados para la transfección del pDNA pueden prepararse utilizando una menor cantidad de lípido catiónico, lo que implica una considerablemente menor citotoxicidad celular. Dependiendo de la fracción molar del lípido catiónico,  $\alpha$ , en el liposoma mixto y de la relación de cargas efectiva,  $\rho_{eff}$ , del lipoplejo, los estudios de SAXS han confirmado por primera vez la coexistencia de dos o tres estructuras lamelares en el mismo lipoplejo, una  $L_{\alpha, DOPE\ rich}$ , una  $L_{\alpha, CL\ rich}$ , y otra  $L_{\alpha, main}$ , esta última presente en todo el intervalo de fracción molar de CL en el liposoma mixto. Los estudios de SAXS y crio-TEM muestran que el pDNA se encuentra formando una monocapa entre las bicapas lipídicas en un estado más compactado que el DNA lineal. Los estudios bioquímicos han aportado información acerca de las posibles aplicaciones biomédicas y de la eficiencia de la transfección *in vitro* en terapia génica. Así, este estudio indica que la transfección del pDNA mediante los lipoplejos  $C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE$ -pDNA, siendo  $n = 2, 3, 5$  ó  $12$ , muestran niveles de toxicidad relativamente baja, menor que el control Lipofectamina2000 y poseen una notable eficiencia en la transfección, sobre todo los lípidos gemini que tienen espaciadores cortos ( $n = 2$  y  $3$ ) entre sus dos cabezas catiónicas.

# How Does the Spacer Length of Cationic Gemini Lipids Influence the Lipoplex Formation with Plasmid DNA? Physicochemical and Biochemical Characterizations and their Relevance in Gene Therapy

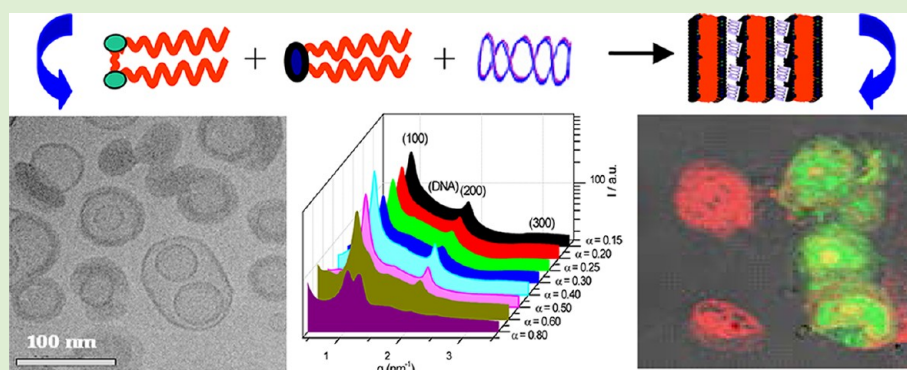
Mónica Muñoz-Úbeda,<sup>†,‡</sup> Santosh K. Misra,<sup>†,§</sup> Ana L. Barrán-Berdón,<sup>‡</sup> Sougata Datta,<sup>§</sup> Clara Aicart-Ramos,<sup>||</sup> Pablo Castro-Hartmann,<sup>⊥</sup> Paturu Kondaiah,<sup>#</sup> Elena Junquera,<sup>‡</sup> Santanu Bhattacharya,<sup>\*,§</sup> and Emilio Aicart<sup>\*,‡</sup>

<sup>‡</sup>Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, and <sup>||</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>§</sup>Departments of Organic Chemistry, and <sup>#</sup>Molecular Reproduction Development and Genetics, Indian Institute of Science, 560012 Bangalore, India

<sup>⊥</sup>Servei de Microscopia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallés, Spain

## Supporting Information



**ABSTRACT:** Lipoplexes formed by the pGFP-C3 plasmid DNA (pDNA) and lipid mixtures containing cationic gemini surfactant of the 1,2-bis(hexadecyl dimethyl ammonium) alkanes family referred to as  $C_{16}C_nC_{16}$  where  $n = 2, 3, 5$ , or  $12$ , and the zwitterionic helper lipid, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE) have been studied from a wide variety of physical, chemical, and biological standpoints. The study has been carried out using several experimental methods, such as zeta potential, gel electrophoresis, small-angle X-ray scattering (SAXS), cryo-TEM, gene transfection, cell viability/cytotoxicity, and confocal fluorescence microscopy. As reported recently in a communication (*J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18014), the detailed physicochemical and biological studies confirm that, in the presence of the studied series lipid mixtures, plasmid DNA is compacted with a large number of its associated  $Na^+$  counterions. This in turn yields a much lower effective negative charge,  $q_{pDNA}^-$ , a value that has been experimentally obtained for each mixed lipid mixture. Consequently, the cationic lipid (CL) complexes prepared with pDNA and CL/DOPE mixtures to be used in gene transfection require significantly less amount of CL than the one estimated assuming a value of  $q_{DNA}^- = -2$ . This drives to a considerably lower cytotoxicity of the gene vector. Depending on the CL molar composition,  $\alpha$ , of the lipid mixture, and the effective charge ratio of the lipoplex,  $\rho_{eff}$ , the reported SAXS data indicate the presence of two or three structures in the same lipoplex, one in the DOPE-rich region, other in the CL-rich region, and another one present at any CL composition. Cryo-TEM and SAXS studies with  $C_{16}C_nC_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes indicate that pDNA is localized between the mixed lipid bilayers of lamellar structures within a monolayer of  $\sim 2$  nm. This is consistent with a highly compacted supercoiled pDNA conformation compared with that of linear DNA. Transfection studies were carried out with HEK293T, HeLa, CHO, U343, and H460 cells. The  $\alpha$  and  $\rho_{eff}$  values for each lipid mixture were optimized on HEK293T cells for transfection, and using these values, the remaining cells were also transfected in absence (-FBS-FBS) and presence (-FBS+FBS) of serum. The transfection efficiency was higher with the CLs of shorter gemini spacers ( $n = 2$  or  $3$ ). Each formulation expressed GFP on pDNA transfection and confocal fluorescence microscopy corroborated the results.  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE mixtures were the most efficient toward transfection among all the lipid mixtures and, in presence of serum, even better than the Lipofectamine2000, a commercial transfecting agent. Each lipid combination was safe and did not show any significant levels of toxicity. Probably, the presence of two coexisting lamellar structures in lipoplexes synergizes the transfection efficiency of the lipid mixtures which are plentiful in the lipoplexes formed by CLs with short spacer ( $n = 2, 3$ ) than those with the long spacer ( $n = 5, 12$ ).

Received: July 11, 2012

Revised: October 23, 2012

Published: November 6, 2012

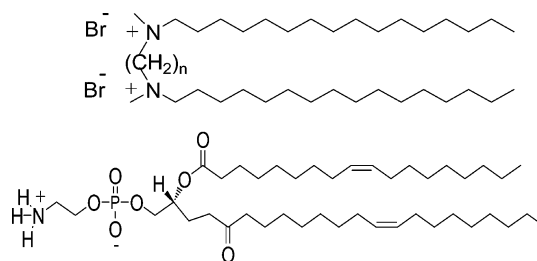
## ■ INTRODUCTION

In the last two decades, the use of nanotechnology has provoked a dramatic development of an extensive number of research areas, particularly in nanomedicine, where gene therapy is an emerging area.<sup>1–17</sup> Although this strategy is highly promising, there are many obstacles that one has to overcome before it can be realized in practice. As more nucleic acid based therapeutics enters the clinic with ever increasing stringent requirements, it is essential to develop systems that are quantitatively and physicochemically defined to ensure reliable and reproducible performance and consistent behavior. Many different types of molecular entities have been extensively used in this respect, that is, cationic lipids having one or two hydrophobic tails, polyelectrolytes, dendrimers, histones, and so on.<sup>2,5,8,10,17–25</sup> In fact, one of the most effective methods to achieve DNA delivery is to use cationic lipids or polymers (instead of viral vectors) that compact DNA by forming lipoplexes or polyplexes, leading to gene transfection without triggering any adverse immune response.<sup>2,4–8,10,17,19,26</sup> The usual procedure is to compact negatively charged DNA by synthetic cationic nanoaggregates (alone or mixed with a zwitterionic helper phospholipid that has a fusogenic property and also decreases the cytotoxicity of the cationic vector). Nevertheless, despite the large amount of experimental data in the literature, it is difficult to fully explain the interactions and mechanisms of the CL-mediated transfection, a feature of importance to provide key information for the design and development of more efficient gene delivery systems.

Recently,<sup>17</sup> we have experimentally demonstrated for the first time that, irrespective of the type of the CL, plasmid DNA, in contrast to linear DNA, is compacted with a large amount of its Na<sup>+</sup> counterions associated, thus, yielding a much lower effective negative charge,  $q_{\text{pDNA}}^-$ . This feature, confirmed through a wide variety of physicochemical and biochemical investigations, is significant for both in vitro and in vivo transfection studies. When a less amount of the cationic lipid is used, the lower is the cytotoxicity. In the presence of a low amount of CL if efficient transfection could be achieved, then the resulting formulation would also be less cytotoxic. The study also emphasizes that it is essential to perform the physicochemical and biological investigations involving plasmid DNA under identical conditions. Furthermore, it is absolutely necessary to consider both the effective pDNA charge,  $q_{\text{pDNA}}^-$ , which must be previously determined from physicochemical experiments, and the effective charge ratio between CL and pDNA,  $\rho_{\text{eff}}$  to fix the appropriate  $\rho_{\text{eff}}$  for the biological studies involving transfection and the determination of cytotoxicity. These parameters are also important in the simulation/theoretical studies.<sup>27,28</sup>

These preliminary findings and conclusions have been fully confirmed and extended in the present full paper where we report the results of a detailed physicochemical and biological investigation of the lipoplexes (CL-DNA) formed by a series of synthetic divalent cationic geminis, 1,2-bis(hexadecyl dimethyl ammonium) alkanes referred to as C<sub>16</sub>C<sub>n</sub>C<sub>16</sub>, with  $n = 2, 3, 5$ , or 12 (Scheme 1), the zwitterionic helper lipid, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine (DOPE), and the pEGFP-C3 plasmid DNA. The paper is organized as follows. First, we report and discuss the zeta potential and gel electrophoresis experiments that furnish (i) the electroneutrality ratio,  $(L/D)_\phi$ , where the positive charges of the cationic lipid and the negative ones of the pDNA balance ( $\rho_{\text{eff}} = 1$ ). This marks the lower limit from which the net charge of the lipoplex is positive, thus, becoming a potentially adequate cell transfecting agent;<sup>8,29</sup> (ii) the effective charge,  $q_{\text{pDNA}}^-$ , of the plasmid DNA; and

**Scheme 1. (a) Molecular Structure of the Cationic Gemini Lipids (C<sub>16</sub>C<sub>n</sub>C<sub>16</sub>), where  $n = 2, 3, 5$ , or 12, and (b) Zwitterionic Helper Lipid, 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE)**



(iii) effective charge ratios between a particular CL and pDNA,  $\rho_{\text{eff}}$ . This allows us to obtain the optimal lipoplex composition for the transfection studies. Second, from the SAXS and cryo-TEM studies, we discuss the lipoplex structures and morphologies formed by pDNA and the mixed cationic gemini lipids/DOPE in the whole cationic lipid composition,  $\alpha$ , of the lipid mixtures. Earlier studies have shown that the lipoplex structures, many of them involving lamellar, hexagonal, or even cubic phases, are closely related to the DNA delivery and the transfection efficiency after endocytosis.<sup>1,21,26,30</sup> In this work and depending on the cationic lipid composition,  $\alpha$ , we report the coexistence of two or three lipoplex structures in a wide range of CL composition and effective charges ratio,  $\rho_{\text{eff}}$ . Finally, we also discuss the transfection efficiency and cytotoxicity of the lipoplexes from the biological studies based on flow cytometry, cell viability, and confocal fluorescence microscopy experiments, for the four cationic gemini lipid/DOPE-pDNA lipoplexes covering the whole cationic lipid composition,  $\alpha$ , and a wide range of the effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}} > 1$ ) between the CL and pDNA. The whole picture of the results indicates that the CL composition,  $\alpha$ , the effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$  and mainly the length of the spacer in the gemini CL play a dramatic role in determining the transfection efficiency. In any case, the entire gemini CLs studied in this work show a high cell viability because their low degree of cytotoxicity.

This work will enrich the understanding of the interactions between the cationic lipid and the plasmid DNA, especially from a quantitative point of view. Thereby, this study provides fundamental information for the biomedical applications and support a practical strategy for carrying out the transfection studies recently proposed by us<sup>17</sup> that permits the determination of the optimum lipoplex formulations, which also guarantees full DNA protection with the minimum amount of the CL.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** All reagents and solvents used in the present study were of highest grade commercially available and all are used purified, dried, or freshly distilled, as required. Starting materials, such as *n*-hexadecyl bromide and  $\alpha,\omega$ -dibromoalkanes, were obtained from Aldrich Chemical Co., while dimethylamine was from Merck, 40% in water. The divalent cationic gemini surfactants 1,2-bis(hexadecyldimethyl ammonium) alkanes referred to as C<sub>16</sub>C<sub>n</sub>C<sub>16</sub> were synthesized according to a reported procedure.<sup>31</sup> Briefly, *N,N*-hexadecyl-*N',N'*-dimethylamine was obtained by refluxing *n*-hexadecyl bromide with dimethylamine at 80 °C in dry ethanol for 24 h. The gemini surfactants were obtained by refluxing the corresponding  $\alpha,\omega$ -dibromoalkanes ( $n = 2, 3, 5$ , or 12) with *N,N*-hexadecyl-*N',N'*-dimethylamine in dry ethanol at 80 °C until the diamine was consumed (~48 h). After removal of the solvent by evaporation, the crude solid residue was recrystallized twice in dry acetone. The resulting product was dissolved in minimum volume of a



mixture of hexane/ethyl acetate for at least three times to eliminate the excess of *n*-hexadecyl bromide. All the compounds were adjudged pure by TLC and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and elemental analysis. Chemical shifts,  $\delta$ , are reported in ppm downfield from the internal standard (TMS), and the pertinent details are given in the Supporting Information (SI). The zwitterionic lipid, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE), of the highest purity, was purchased from Avanti Polar Lipids and was used as received.

Although in typical biological studies only small quantities (micrograms) of DNA are employed, in the biophysical studies large amounts (milligrams) are required. For that reason, the plasmid purification was performed using the GenElute HP Select Plasmid Gigaprep Kit (Sigma-Aldrich). Competent *E. coli* DH5 $\alpha$  cells were transformed with the pEGFP-C3 plasmid DNA. An overnight culture of 10 mL of Luria Broth (LB) medium inoculated with a single colony from a fresh plate was diluted in 50 mL of LB, and the new culture was grown at 37 °C while shaking for 9 h. This culture was used to inoculate each of the two 2 L flasks containing 1 L of LB medium. All the cultures were grown in the presence of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kanamycin. The cultures were grown at 37 °C for 15–18 h before cells were harvested by centrifugation at 7000 rpm, at 4 °C for 15 min in a F10S rotor (Sorvall, U.S.A.). The wet bacterial pellet was frozen in plastic bags and stored at –20 °C until the Gigaprep was carried out (2 L of culture for each Gigaprep). The recovered plasmid DNA (4700 bp) was predominantly in its supercoiled conformation, as determined from ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis. The recovery and purity of the pDNA was determined by a spectrophotometric analysis. The recovered elute from each Gigaprep was lyophilized because a more concentrated plasmid preparation in HEPES was desired.

**Preparation of Lipid Mixtures and Lipoplexes.** Appropriate amounts of gemini surfactant,  $L^+$ , and DOPE,  $L^0$ , were dissolved in chloroform to obtain the desired CL composition,  $\alpha$ , of the mixed liposomes. After brief vortexing this solution, chloroform was removed by evaporation under high vacuum to yield a dry lipid film. For removal of the last traces of the organic solvent, the films were further maintained under high vacuum. The resulting dry lipid films were then hydrated with HEPES, pH = 7.4, and homogenized with the help of alternating cycles of vigorous vortexing, sonication, and moderate heat. This combination of vortexing, sonication, and heat yields MLVs, which were transformed into the desired unilamellar liposomes, LUVs, by a sequential extrusion procedure, widely explained elsewhere.<sup>32</sup> A stock solution of pDNA was prepared two days before the mixing with mixed lipids. pDNA concentrations (expressed in mM base pairs) were determined by absorbance at 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).<sup>33,34</sup>

For the lipoplex preparation, equal volumes of pDNA and  $\text{C}_{16}\text{C}_n\text{C}_{16}/\text{DOPE}$  ( $n = 2, 3, 5$ , or 12) extruded liposomal suspensions were mixed by adding pDNA over mixed liposomes. The mixing process was done at an addition speed of 0.2 mL/min, with continuous, constant, and vigorous magnetic stirring. Once the addition was concluded, the solution was maintained under agitation during 10 min to favor the formation of lipoplexes. pDNA concentrations were chosen to fit the optimum conditions for each experimental technique, as follows: 0.05 mg/mL for zeta potential, 200 ng/well for gel electrophoresis, 1 mg/mL for cryo-TEM, 5 mg/mL for SAXS, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for transfection efficiency and confocal fluorescence microscopy, and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for cell viability assays.

**Experimental Methods.** The phase Analysis Light Scattering technique (Zeta PALS, Brookhaven Instrum. Corp., U.S.A.) was used to measure electrophoretic mobilities (and from it, zeta potential).<sup>16,35</sup> This interferometric technique uses phase analysis light scattering to determine the electrophoretic mobility of the charged colloidal suspensions. Each electrophoretic mobility data point is taken as an average over 50 independent measurements. Solutions were prepared with deionized water buffered with HEPES at physiological conditions (pH = 7.4). Electrophoretic mobility for liposome and lipoplex suspensions was measured, at each cationic lipid composition,  $\alpha$ , as a function of the lipoplex composition ( $L/D$ , lipid to DNA mass ratios). In all the cases, zeta potential,  $\zeta$ , has been obtained from the electrophoretic mobility,  $\mu_e$ , using the well-known Henry equation:

$$\zeta = 3\eta\mu_e / (2\epsilon_0\epsilon_f f(\kappa_D a)) \quad (1)$$

where  $\eta$  is the viscosity of water;  $\epsilon_0$  and  $\epsilon_f$  are the vacuum and relative permittivity, respectively;  $f(\kappa_D a)$  is the Henry function that depends on the reciprocal Debye length,  $\kappa_D$ ; and the hydrodynamic particle radius,  $a$ . For medium-to-large particles in a medium of moderate ionic strength ( $a \gg \kappa_D^{-1}$ ), Smoluchowski limit is usually applied ( $f(\kappa_D a) = 1.5$ ) to estimate the Henry function.<sup>36,37</sup>

Gel electrophoresis studies of lipoplexes along with uncomplexed, pure plasmid DNA were loaded onto 1% agarose gel and run for 30 min at 100 mV in 1 $\times$  TAE (Tris-HCl, acetate, and EDTA) buffer. Agarose gels were run on 120 mV for 20 min. In all the lipoplexes, the amount of DNA was 200 ng along with same amount of uncomplexed DNA, which was loaded as a positive control. Then, gels were photographed under UV light illumination at 365 nm for 300 ms. Fully complexed DNA appears as fluorescent bands in the wells of the gel while the uncomplexed DNA appears outside the well and the fully complexed DNA did not move outside. The amount of liposome required to produce electrically neutral lipoplex was termed as DNA binding efficiency of the liposome. Fluorescence intensity of each band was measured by using commercial Alfa-digi-Doc software provided with Gel-Doc instrument (UV-pro-platinum). The band intensity for the free DNA was considered as 100% and other intensities were estimated accordingly.

Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were carried out on the Beamline 16 at European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble (France). The energy of the incident beam was 12.6 KeV ( $\lambda = 0.995 \text{ \AA}$ ). Samples were placed in sealed glass capillaries purchased from Hilgenberg with an outside diameter of 1.5 mm and wall thickness of 0.01 mm. The scattered X-ray was detected on MARCCD 165 (2048  $\times$  2048 pixels highest achievable resolution, pixel size 78  $\mu\text{m}$ ), converted to one-dimensional scattering by radial averaging, and represented as a function of the momentum transfer vector  $q$  ( $= 4\pi \sin \theta / \lambda$ ), in which  $\theta$  is half the scattering angle and  $\lambda$  is the wavelength of the incident X-ray beam. The sample to detector distance was maintained at 1.4 m. Measurements on each sample were collected over 5–20 s each. SAXS experiments were run at different cationic lipid compositions,  $\alpha$ , for the lipoplexes formed with pDNA. Solutions were prepared using deionized water buffered with HEPES at pH = 7.4.

Samples for cryo-TEM experiments were prepared essentially following the general procedures described by several groups.<sup>38,39</sup> In these experiments, we have used perforated Quantifoil R1.2/1.3 (hole diameter 1.2  $\mu\text{m}$ ) on a 400-mesh copper grid. After glow-discharge to make hydrophilic the holey film, a 2.3  $\mu\text{L}$  drop of the sample was deposited onto the film. Then the grid was mounted on a plunger (Leica EM-CPC) and blotted with a Whatman No. 4 filter paper. The aqueous suspension of lipoplex within the holes was immediately vitrified by rapid immersion in liquid ethane. The specimen grid under liquid nitrogen was mounted on a Gatan 626 cryotransfer system. Images were obtained using a Jeol JEM 2011 cryo-electron microscope operated at 200 kV, under low-dose conditions, and using different degrees of defocus (500–700 nm) to obtain an adequate phase contrast.<sup>40</sup> Images were recorded on a Gatan 794 Multiscan digital camera. These CCD images were processed and analyzed with a Digital Micrograph version 1.8.0 and were saved in a .dm3 format. Selected sections were plotted with the Profile tool to obtain histograms of gray level versus distance. For that purpose, a square was drawn through a desired section of each image and the noise on the histograms was reduced by averaging the information over 30 pixels width.

Transfection of pEGFP-C3 plasmid DNA across HEK293T, HeLa, H460, CHO, and U343 cells using lipid mixtures  $\text{C}_{16}\text{C}_n\text{C}_{16}/\text{DOPE}$  ( $n = 2, 3, 5$ , and 12) was performed in absence (-FBS-FBS) or presence (-FBS+FBS) of serum. Lipoplexes were prepared using 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of plasmid DNA (pDNA) diluted with plain DMEM (Sigma-Aldrich). The amount of mixed lipids was added to 0.8  $\mu\text{g}$  of pDNA in such a way that it gave the desired charge ratio,  $\rho$ . The volume of the mixture was made up to 100  $\mu\text{L}$  with plain DMEM and mildly spun to settle the whole lipoplex in DMEM present in the centrifuge tube. After 30 min of incubation at room temperature, the lipoplex suspension was further diluted with either 100  $\mu\text{L}$  of plain DMEM without serum (-FBS-FBS) or with 100  $\mu\text{L}$  of 20% FBS containing DMEM in presence of serum (-FBS+FBS) where -FBS+FBS and -FBS-FBS stands for the lipoplex

preparation without serum and the subsequent addition of serum to the lipoplexes during the incubation with cells. Then 200  $\mu\text{L}$  of lipoplex suspensions without serum or with 10% FBS containing DMEM were added to each well of 24 wells plated with  $\sim 60000$  cells, which were washed with plain DMEM. Experiments were performed in duplicate and repeated twice independently for each  $\rho_{\text{eff}}$ . After 6 h of incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$  and 99% humidity with a regular supply of 5%  $\text{CO}_2$ , old medium was removed from the wells. Cells were washed with plain DMEM and further 500  $\mu\text{L}$  of 10% FBS containing DMEM were added to the cells. Cells were further incubated for  $\sim 48$  h in the above-mentioned conditions. At the end of the incubation, cells were washed with 200  $\mu\text{L}$  of DPBS and harvested and collected in 200  $\mu\text{L}$ /well of 5% FBS containing DPBS after trypsinization with 1 $\times$  trypsin (Sigma-Aldrich). Collected cells were carried for Flow Assisted Cell Sorting (FACS). Cells were passed through laser filter at 488 nm, which provides information about the number of cells with higher green fluorescence (% GFP cells), compared to the residual fluorescence of the cells as well as the average intensity of fluorescence per cell (mean fluorescence intensity (MFI)). Data were analyzed using public domain software WinMDI 2.8. Results were plotted as % GFP cells and MFI against charge ratio,  $\rho_{\text{eff}}$ , on Graph pad prism 5.0 software. Lipofectamine2000 was used as a positive control during all the transfection experiments.

Cell viability/cytotoxicity of each lipid formulation toward HEK293T cells was determined by using 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide reduction method (MTT assay) following literature procedure.<sup>41,42</sup> Nearly 15000 cells were plated in 96-well plates (Nunc, Denmark) and grown till  $\sim 70\%$  confluence. Lipoplexes were prepared using pDNA (1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) when 200  $\mu\text{L}$  was added to each well at various charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$ . Lipoplexes were incubated with cells for 6 h. Cells were washed and reincubated with 10% FBS containing the growth medium. After 42 h, 20  $\mu\text{L}$  of MTT were added to each well and the mixtures were further incubated for 4–5 h. Blue formazan crystals were seen when checked under a microscope. Media were removed and 200  $\mu\text{L}$  of DMSO were added per well and kept on a flat rocker for 10 min to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured using a microtiter plate reader. The % cell viability was then calculated from readings obtained from ELISA reader using

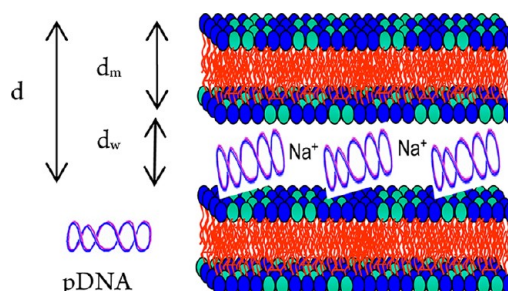
$$\% \text{viability} = \frac{A_{590, \text{treated cells}} - A_{590, \text{background}}}{A_{590, \text{untreated cells}} - A_{590, \text{background}}} \times 100 \quad (2)$$

Confocal fluorescence microscopy studies were performed on pEGFP-C3 plasmid DNA transfected to HEK293T cells, in the same way as described under transfection experiments. Cells, plated on glass slips placed in wells of 12-well plates, were grown till cell-monolayer gained  $\sim 80\%$  confluence. The experiments were performed using 0.8  $\mu\text{g}$  DNA per well. Working stocks of the lipoplexes were prepared in DMEM with (-FBS+FBS) and without (-FBS-FBS) serum by conventional method. Cells were treated with these lipoplexes for 6 h, followed by 42 h of incubation in the presence of 10% FBS containing DMEM. Control experiments were performed in each case using commercial transfection reagent, Lipofectamine2000, using a protocol specified by the manufacturers, in the absence (-FBS-FBS) and presence (-FBS +FBS) of serum. After 42 h of incubation, the entire medium was removed from the wells and cells were washed properly with DPBS buffer and all the cell debris were carefully removed without disturbing the monolayer of cells. Cells were fixed for 10 min using 1 mL of 4% paraformaldehyde each well, washed with DPBS for  $3 \times 10$  min, and then incubated with 1 mL of 0.1% Triton X-100 for 5 min to increase the membrane permeabilization. Cells were washed with DPBS for  $3 \times 10$  min. Then glass slips were fixed and the permeabilized monolayers of HEK293T cells were taken out from the wells, kept on glass slides and incubated for 5 min with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of propidium iodide (PI) to specifically stain the nucleus of the cells. Further cells were washed with DPBS for  $3 \times 10$  min to remove extra PI and to reduce overstaining. Then vector shield was used to mount the cell possessing glass slips on the glass slides. Samples were finally observed under confocal microscope (Zeiss LSM 510-Meta Apochromat).

## RESULTS AND DISCUSSION

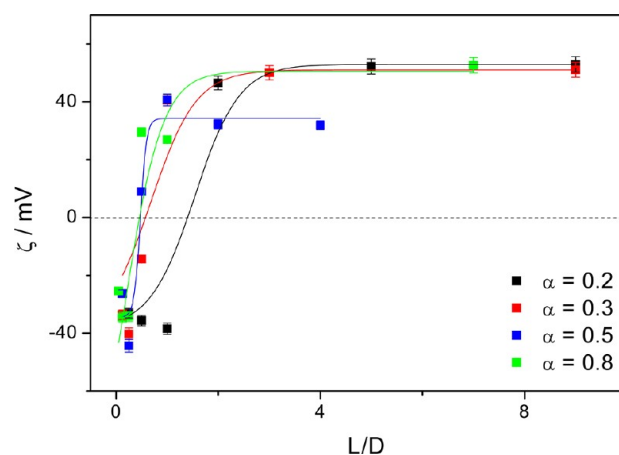
**Isonutrality Ratio of the CL/DOPE-pDNA Lipoplexes and the Effective Charge of pDNA.** It is well-known that CL-pDNA lipoplexes must be cationic to bind to cell surfaces, which suggests that the net CL charges must be higher than those of the pDNA. For that reason, prior to performing any biological study, one must determine the minimum amount of CL that is needed to yield a cationic lipoplex to render the latter a potential gene vector.<sup>8,29</sup> On the other hand, the plasmid DNA is a circular form of DNA that at physiological pH may adopt a supercoiled conformation depending on the ionic strength (Scheme 2).

**Scheme 2. Lamellar Structure of the  $\text{C}_{16}\text{C}_n\text{C}_{16}$ /DOPE-pDNA Lipoplexes**



As we have demonstrated recently,<sup>17</sup> this supercoiling effect renders a less effective negative charge of the biopolymer than its nominal charge. Because it is related to the net charge of the nanoaggregates, zeta potential,  $\zeta$ , is the best physicochemical property that provides this information.

Figure 1 shows, as an example, the plots of  $\zeta$  values for the  $\text{C}_{16}\text{C}_2\text{C}_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplex at several cationic lipid



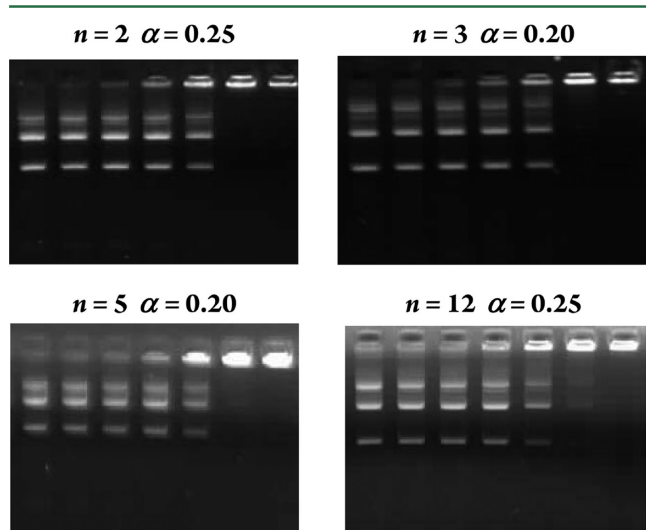
**Figure 1.** Plot of zeta potential,  $\zeta$ , against the lipoplex composition ( $L/D$ ) of  $\text{C}_{16}\text{C}_2\text{C}_{16}$ /DOPE-pDNA at different CL compositions,  $\alpha$ , in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4. Solid line: sigmoid fit of experimental values. Errors are within  $\pm 5\%$ , [pDNA] = 0.05 mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on the CL composition, to cover a wide ( $L/D$ ) range.

compositions,  $\alpha$ , against the lipoplex composition, ( $L/D$ ), where  $L$  is the total mass of the lipid obtained as the sum of the CL,  $L^+$ , and the helper lipid,  $L^0$ , masses, and  $D$  is the mass of pDNA. Additional results are included in the SI. Typical sigmoidal profiles are observed (Figure 1), the curves showing an inversion of sign at a particular ( $L/D$ ) ratio corresponding to  $\rho_{\text{eff}} = 1$ .

**Table 1.** Values of the Isoneutrality Ratio,  $(L/D)_\phi$ , for  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA ( $n = 2, 3, 5$ , or  $12$ ) at Several CL Compositions,  $\alpha$ , Experimentally Obtained from the Zeta Potential,  $(L/D)_{\phi,\zeta}$  Measurements and Estimated from Eq 3,  $(L/D)_{\phi,est}$

| $\alpha$ | $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA |                    | $C_{16}C_3C_{16}/DOPE$ -pDNA |                    | $C_{16}C_5C_{16}/DOPE$ -pDNA |                    | $C_{16}C_{12}C_{16}/DOPE$ -pDNA |                    |
|----------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|
|          | $(L/D)_{\phi,\zeta}$         | $(L/D)_{\phi,est}$ | $(L/D)_{\phi,\zeta}$         | $(L/D)_{\phi,est}$ | $(L/D)_{\phi,\zeta}$         | $(L/D)_{\phi,est}$ | $(L/D)_{\phi,\zeta}$            | $(L/D)_{\phi,est}$ |
| 0.15     | 1.59                         | 7.60               | 2.26                         | 7.63               | 0.93                         | 7.67               | 0.58                            | 7.82               |
| 0.20     | 1.89                         | 5.70               | 1.74                         | 5.72               | 0.81                         | 5.76               | 0.77                            | 5.91               |
| 0.25     | 0.98                         | 4.55               | 1.20                         | 4.57               | 0.72                         | 4.62               | 0.72                            | 4.77               |
| 0.30     | 0.52                         | 3.79               | 1.42                         | 3.81               | 0.74                         | 3.85               | 0.53                            | 4.01               |
| 0.40     | 0.49                         | 2.84               | 0.32                         | 2.86               | 0.39                         | 2.90               | 0.69                            | 3.05               |
| 0.50     | 0.50                         | 2.26               | 0.36                         | 2.28               | 0.39                         | 2.33               | 0.71                            | 2.48               |
| 0.60     | 0.63                         | 1.88               | 0.37                         | 1.90               | 0.59                         | 1.95               | 1.11                            | 2.10               |
| 0.80     | 0.44                         | 1.41               | 0.24                         | 1.43               | 0.52                         | 1.47               | 1.06                            | 1.62               |
| 1        | 0.37                         | 1.12               | 0.19                         | 1.14               | 0.35                         | 1.18               | 0.79                            | 1.33               |

This permits the experimental determination of the isoneutrality ratio  $(L/D)_\phi$  (see Table 1 for the entire set of results). As expected, for a given pDNA concentration, the increase in the CL composition,  $\alpha$ , leads to a decrease in the  $(L/D)_\phi$  value (see Figure 1, Table 1 and Figure S-1 of the SI). The values obtained from the gel electrophoresis experiments (see Figure 2, as an example) are in very good agreement with the zeta potential results.



**Figure 2.** Gel electrophoresis results for  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA ( $n = 2, 3, 5$  or  $12$ ) lipoplexes at selected CL compositions,  $\alpha$ , as examples, and as a function of lipoplex composition  $(L/D)$ . The  $L/D$  values of each line are 0, 0.13, 0.25, 0.5, 1, 2, and 4.

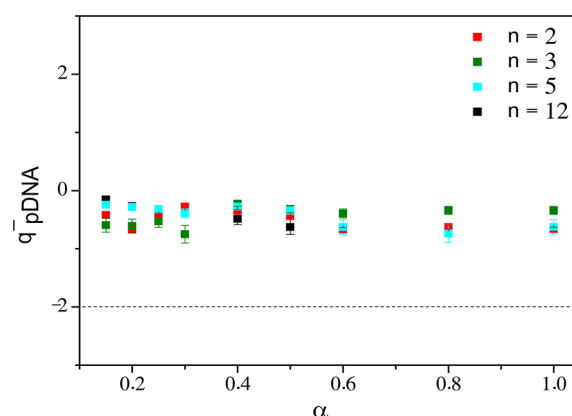
The values of  $(L/D)_\phi$  for any lipoplex may also be estimated from the molecular properties of the components by<sup>17</sup>

$$(L/D)_\phi = q_{pDNA}^{-} [\alpha M_{L^+} + (1 - \alpha) M_{L^0}] / (q_{L^+}^+ \alpha \bar{M}_{bp}) \quad (3)$$

where  $M_{L^+}$  and  $M_{L^0}$  and  $\bar{M}_{bp}$  are the molar masses of the cationic and helper lipids, and the average molar mass per DNA base pair, respectively; and  $q_{L^+}^+$  and  $q_{pDNA}^{-}$  are the effective charges of the CL and DNA base pair forming the lipoplex. Previous studies<sup>16,17,32</sup> have confirmed that only when linear DNA (i.e., calf thymus (ctDNA)) is used to form the lipoplex with the cationic lipid, nominal and effective charges coincide ( $q_{ctDNA}^{-} = -2$ ) and, accordingly, estimated  $(L/D)_\phi$  values match with the experimental ones. However, the estimated values,  $(L/D)_{\phi,est}$  using eq 3 (see Table 1) are significantly higher than those obtained experimentally for the lipoplexes with the supercoiled pDNA, indicating that its effective charge must be considerably lower.<sup>17</sup>

An average value of  $q_L^+ = 2.00 \pm 0.05$  has been experimentally determined from zeta potential measurements of lipoplexes formed by linear ctDNA ( $q_{ctDNA}^{-} = -2$ ) and the CLs used in this work.

For the above-mentioned reasons, it is necessary to determine the effective charge of pDNA,  $q_{pDNA}^{-}$ , in the lipoplex, a value that can be obtained from eq 3 using the  $(L/D)_\phi$  values determined experimentally from the zeta potential measurements. Figure 3,



**Figure 3.** Effective pDNA charge for  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA ( $n = 2, 3, 5$ , or  $12$ ) lipoplexes vs CL composition,  $\alpha$ . Dashed line corresponds to a preassumed value of  $q_{pDNA}^{-} = -2$ .

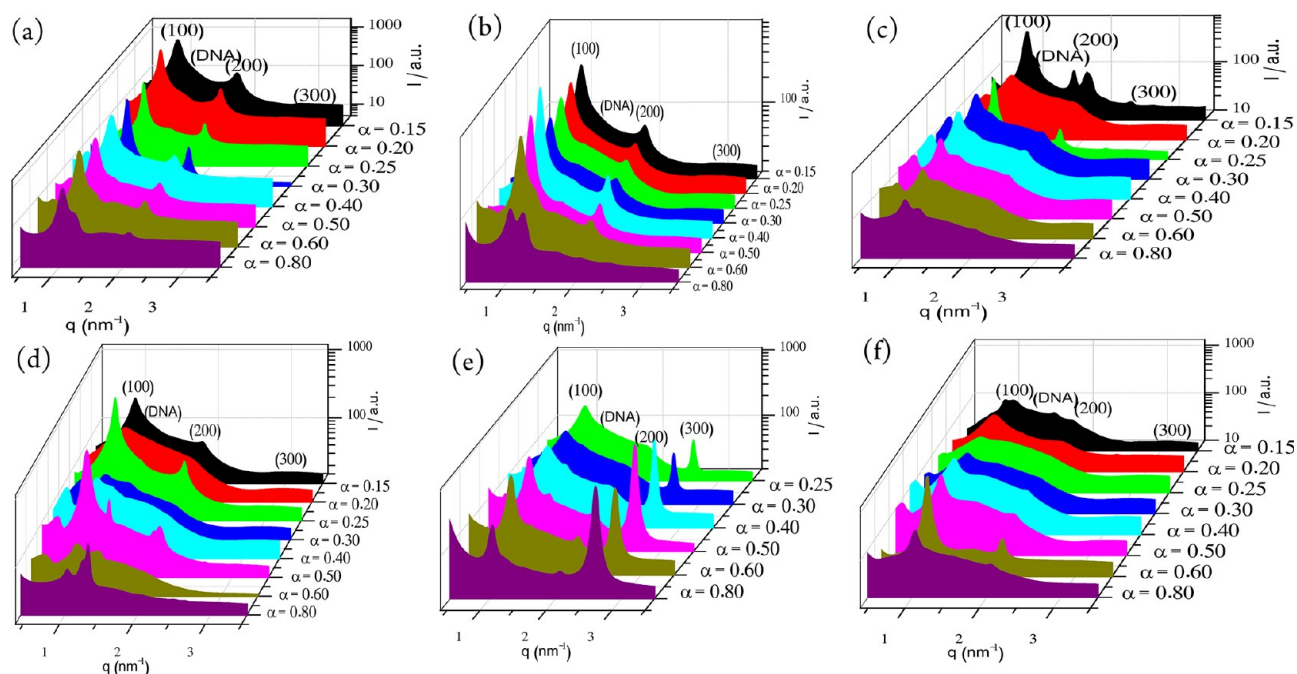
where these  $q_{pDNA}^{-}$  values are plotted against the CL composition,  $\alpha$ , for the systems studied in this work, shows a pDNA charge per base pair significantly less negative than the expected ( $-2$ ). We have obtained  $q_{pDNA}^{-} = (-0.45 \pm 0.15)$  on average, irrespective of the gemini CL or the CL composition,  $\alpha$ , of the lipoplexes. This result, similar to the average  $q_{pDNA}^{-}$  value recently determined by us for pDNA with other lipoplexes<sup>17</sup> is in agreement with the surface compaction of DNA by the CL membranes.<sup>43,44</sup> Thus, the spatial dimension available plays a key role in determining the DNA binding ability of the lipoplexes.

Accordingly, the pDNA compaction process also requires the knowledge of the effective charge ratio,  $\rho_{eff}$  between the positive charges of CL and the effective negative charges of pDNA phosphate groups,  $q_{pDNA}^{-}$ , which can be obtained by<sup>17</sup>

$$\rho_{eff} = (q_{L^+}^+ L^+ / M_{L^+}) / (q_{pDNA}^{-} D / \bar{M}_{bp}) \quad (4)$$

This quantity is the key not only to characterize the lipoplexes from a biophysical point of view, but mainly to prepare them for the optimum conditions toward transfection, that is, with the lowest level of cytotoxicity. As the lipoplexes must be positive to





**Figure 4.** SAXS diffractograms of  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes at several CL compositions,  $\alpha$ , and effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$ : (a)  $\rho_{\text{eff}} = 2$ , (b)  $\rho_{\text{eff}} = 4$ , (c)  $\rho_{\text{eff}} = 6$ , (d)  $\rho_{\text{eff}} = 8$ , (e)  $\rho_{\text{eff}} = 10$ , and (f)  $\rho_{\text{eff}} = 12$ .

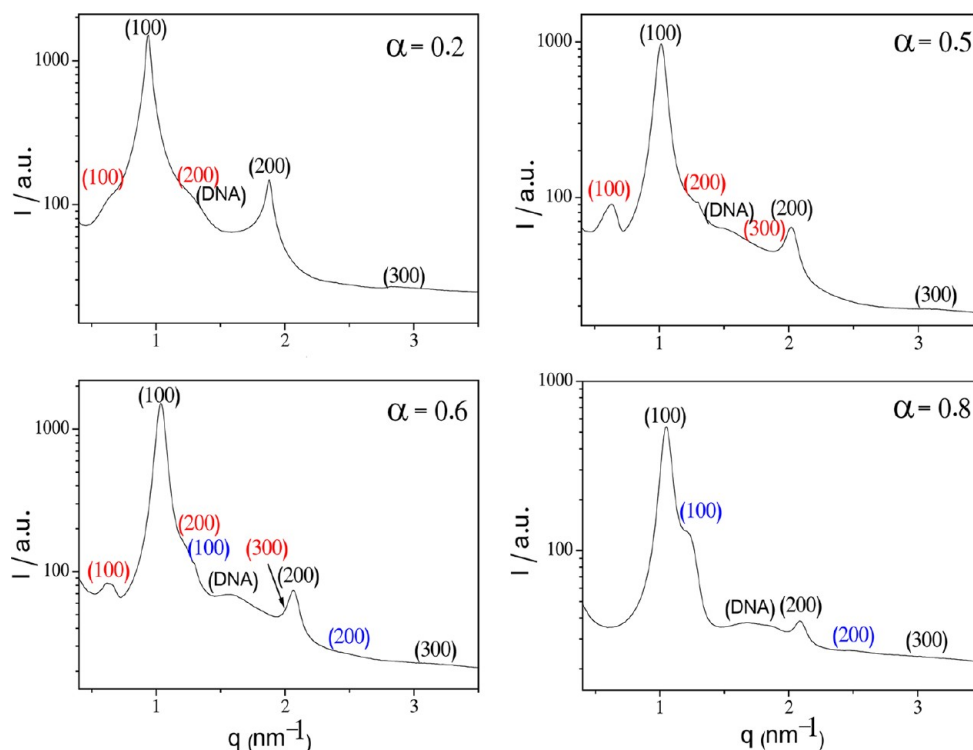
adhere to cellular membranes, the new finding reported by us, indicating that  $q_{\text{pDNA}}^-$  is less negative than expected, implies that less amount of CL is required to prepare appropriate lipoplexes with pDNA (only  $\sim 25\%$  than that expected if  $q_{\text{DNA}}^-$  was  $-2$ ) for carrying out effective transfection.

**Structure and Morphology of the Lipoplexes.** Lipoplex structure, size, and morphology are well-known to be key factors that determine the transfection efficiency.<sup>1,20,21,26,30,45</sup> In this section, the results of the studies of the  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes by means of SAXS and cryo-TEM experiments have been included. PALS technique has been used as well to determine the sizes of the mixed liposomes at the same CL compositions,  $\alpha$ , than those studied by zeta potential. Average hydrodynamic diameters of  $102 \pm 15$ ,  $109 \pm 10$ ,  $100 \pm 8$ , and  $97 \pm 8$  nm, consistent with the sequential extrusion protocol applied to the mixed liposomes,<sup>32</sup> were obtained for the  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$  mixed liposomes, where  $n = 2, 3, 5$ , or  $12$ , respectively. SAXS experiments were run for the  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes, covering the whole CL composition,  $\alpha$ , of the mixed lipid, and at a wide range of effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$ . Figure 4a–f shows, as an example, the sets of SAXS diffractograms for the  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes, where the intensity is plotted versus  $q$  factor (more results are reported in Figures S-2–4 of the SI). All the diffractograms show three peaks that index well to a lamellar structure ( $L_{\alpha,\text{main}}$ ) with the interlayer distance,  $d$ , directly related to the  $q$  factor ( $d = 2\pi/q_{100}$ ), being the Miller indexes reported in the above-mentioned figures. Based on this, and according to the Chart 2, lipoplexes may be represented as alternating layers of the mixed lipids and the supercoiled plasmid DNA, where  $d$  is the sum of the thicknesses of the lipid bilayer,  $d_m$ , and the pDNA aqueous layer,  $d_w$ . The Bragg broad peak that appears in the middle of all diffractograms arise from the DNA–DNA correlation, and its  $q_{\text{pDNA}}$  factor permits the determination of the separation between pDNA in the monolayer,  $d_{\text{qDNA}} (= 2\pi/q_{\text{pDNA}}$ ; Scheme 2).

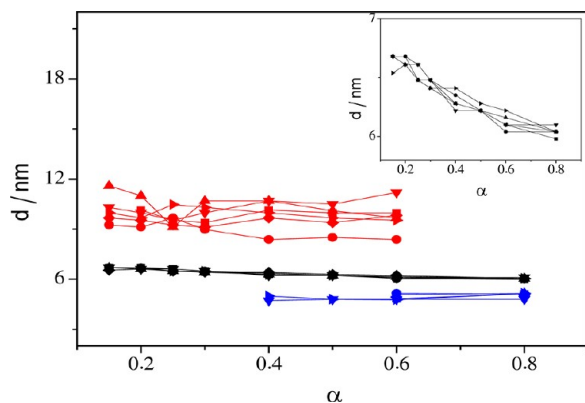
Moreover, most of the diffractograms show more peaks than those previously assigned, as can be clearly seen in Figure 5,

where attention is focused in some selected  $\alpha$  values, at one chosen effective charge ratio ( $\rho_{\text{eff}} = 2$ ). These remaining peaks index well to two additional sets of lamellar structures, one in blue ( $L_{\alpha,\text{CL-rich}}$ ) in the cationic lipid rich region ( $\alpha \geq 0.5$ ), and another in red ( $L_{\alpha,\text{DOPE-rich}}$ ) in the DOPE (helper lipid) rich region ( $\alpha \leq 0.5$ ). In some cases (between  $0.4 \leq \alpha \leq 0.6$ ), diffractograms even indicate the presence of the three coexisting lamellar structures (Figure 5c). However, the  $L_{\alpha,\text{DOPE-rich}}$  lamellar structure is not entirely unambiguous because (i) it was difficult to find some peaks with very low intensities and (ii) it may be reasonable to think that one intermediate peak could be hidden by the higher peak of the main structure. In other words, what has been assigned to be the  $L_{\alpha,\text{DOPE-rich}}$  lamellar structure, may also be an inverted hexagonal one, in agreement with what is expected for DOPE, a lipid known to form hexagonal structures instead of lamellar ones.<sup>1,35</sup> Irrespective of whether lamellar or hexagonal, the presence of an additional structure in the DOPE-rich region is, however, clear. Values of  $q_{100}$ ,  $d$ ,  $q_{\text{pDNA}}$ , and  $d_{\text{pDNA}}$  for all the structures found at any  $\alpha$  and  $\rho_{\text{eff}}$  and for all  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes are given in the SI (Tables S-1–4). This lipid demixing phenomena, as suggested above, driving to two sets of coexisting lamellar structures, is not new because a similar behavior has been already found elsewhere<sup>46</sup> for DOTAP/DOPC-linear DNA lipoplexes in the helper lipid-rich region (i.e.,  $\alpha = 0.2$ ). It is remarkable that the present work reports for the first time the presence of three different structures in the same lipoplex. The whole picture of the SAXS study indicates that the diffractograms are “smoother” when there are increases in (a) the CL composition,  $\alpha$ , (b) the effective charge ratio,  $\rho_{\text{eff}}$ , and (c) the length of the gemini CL spacer (for  $n = 2$  or  $3$ , more diffractograms show two coexisting lamellar structures than for longer gemini spacer,  $n = 5$  or  $12$ ).

Figure 6 (and Figure S-5a–c of SI) shows the plots of the periodic distance of the three lamellar structures,  $d$ , versus  $\alpha$ , at all  $\rho_{\text{eff}}$  values for the four  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes. As can be seen, the lamellar distance,  $d$ , of the three lamellar



**Figure 5.** SAXS diffractograms of  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes at several CL compositions,  $\alpha$ , and at an effective charge ratio  $\rho_{\text{eff}} = 2$ , showing the coexistence of different lamellar  $L_\alpha$  structures:  $L_{\alpha,\text{main}}$  (black),  $L_{\alpha,\text{DOPE-rich}}$  (red), and  $L_{\alpha,\text{CL-rich}}$  (blue).

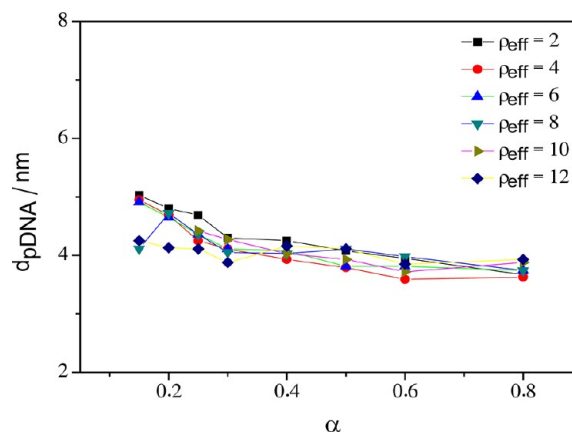


**Figure 6.** Plots of the periodic distance of the lamellar structure,  $d$ , for  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes as a function of CL composition,  $\alpha$ , at several effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$ : red symbols,  $L_{\alpha,\text{DOPE-rich}}$  structure; black symbols,  $L_{\alpha,\text{main}}$  structure; and blue symbols,  $L_{\alpha,\text{CL-rich}}$  structure. The inset is a zoom view of the  $L_{\alpha,\text{main}}$  structure. In all the structures,  $\rho_{\text{eff}}$  is up triangles, 2; diamonds, 4; down triangles, 6; circles, 8; squares, 10; and lateral triangles, 12.

structures follows the trend ( $d_{L_{\alpha,\text{CL-rich}}} \approx 5 \text{ nm}$ ) < ( $d_{L_{\alpha,\text{main}}} \approx 6\text{--}7 \text{ nm}$ ) < ( $d_{L_{\alpha,\text{DOPE-rich}}} \approx 9\text{--}11 \text{ nm}$ ). Such a scenario may be attributed to a combination of factors like (i) a thinner bilayer,  $d_m$ , as  $\alpha$  increases, because the length of the  $C_{16}C_2C_{16}$  gemini surfactants are a little shorter than that of DOPE, (ii) a higher compaction of pDNA, and consequently, it leads to a decrease of  $d_w$ , as  $\alpha$  increases, and (iii) a general increase of  $d$  in the DOPE rich region because of the negligible presence of pDNA between the bilayers which ensures that  $d_m$  and mainly  $d_w$  of the buffer solution must increase markedly. For the  $L_{\alpha,\text{main}}$  structure, the values of  $d$  slightly decrease (7 to 6 nm) with  $\alpha$ , which may be attributed to a combination of the previously mentioned (i) and

(ii) factors. If a value of  $d_m \approx 4\text{--}5 \text{ nm}$  is assumed for the  $L_\alpha$  structure, the thickness obtained for the pDNA monolayer ( $d_w \approx 2 \text{ nm}$ )<sup>17</sup> is consistent with a highly compacted pDNA conformation compared with linear ctDNA ( $d_w \approx 2.5 \text{ nm}$ ).<sup>4,18,35</sup>

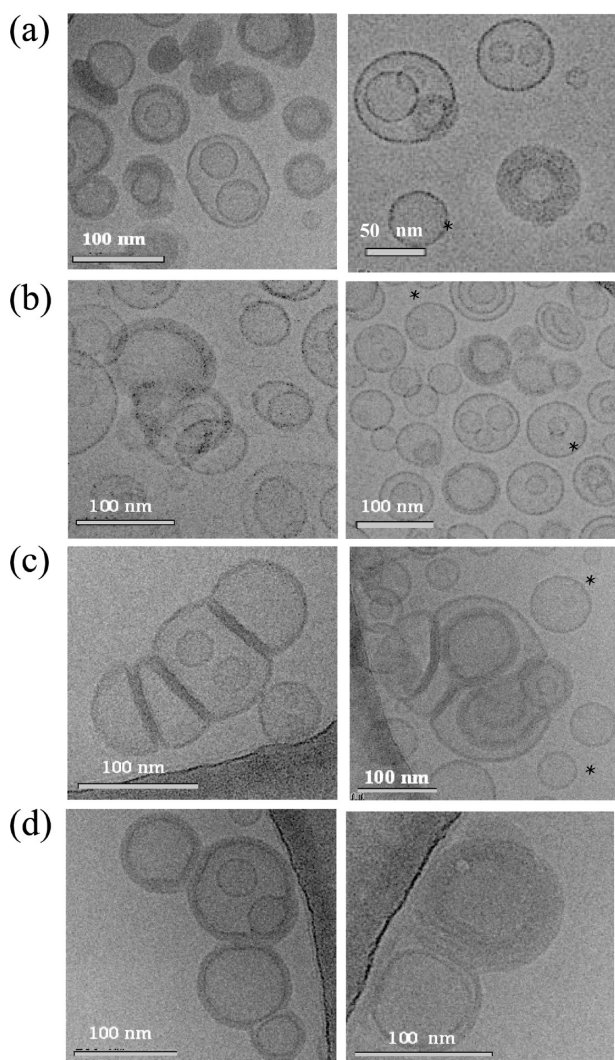
The values of  $d_{\text{pDNA}}$ , plotted against the CL composition,  $\alpha$ , in Figure 7 (and Figure S-6a–c of SI), range from 5 to 3 nm.



**Figure 7.** Plots of the distance  $d_{\text{pDNA}}$  for  $C_{16}C_2C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes as a function of CL composition,  $\alpha$ , at several  $\rho_{\text{eff}}$  ratios.

Because the peak related to the DNA–DNA correlation is very broad, it has been assigned to both lamellar structures,  $L_{\alpha,\text{main}}$  and  $L_{\alpha,\text{CL-rich}}$ . All figures show, as expected, a slight decrease of  $d_{\text{pDNA}}$  with  $\alpha$  for all the lipoplexes and at all the effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$ , because, at constant charge ratio, the  $d_{\text{pDNA}}$  should decrease as the CL composition,  $\alpha$ , in the lipoplex increases. Such a behavior has been previously reported for other kinds of lipoplexes as well.<sup>17,25,43,46–48</sup>



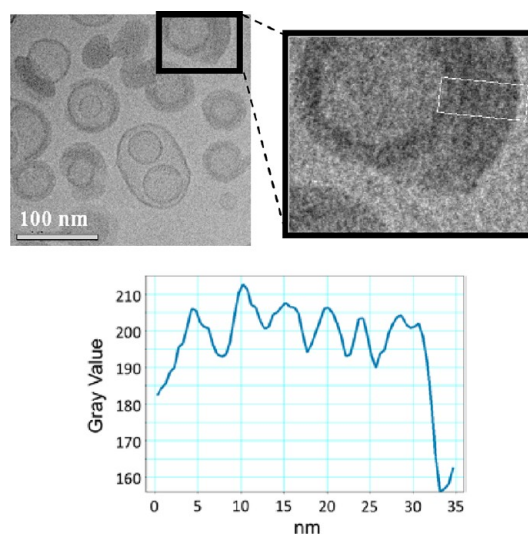


**Figure 8.** Selection of cryo-TEM micrographs showing a general view of the  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes: (a)  $n = 2$  at  $\alpha = 0.5$  and  $\rho_{\text{eff}} = 15.7$ ; (b)  $n = 3$  at  $\alpha = 0.5$  and  $\rho_{\text{eff}} = 15.6$ ; (c)  $n = 5$  at  $\alpha = 0.25$  and  $\rho_{\text{eff}} = 9.6$ ; and (d)  $n = 12$  at  $\alpha = 0.25$  and  $\rho_{\text{eff}} = 9.0$ . Asterisks point to some images of mixed liposomes that coexist with the lipoplexes.

Cryo-TEM experiments were run on  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$  liposomes and on positively charged  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplex samples ( $\rho_{\text{eff}} > 1$ ). Figure 8 reports a selection of micrographs showing images of lipoplexes and some liposomes (see asterisks, for examples). From the analysis of the images for the mixed liposomes (those shown in Figure 8 and others not shown) it has been concluded that they consist mostly of unilamellar and spherical nanostructures, with average diameters around  $90 \pm 10$  nm, in very good agreement with the sizes determined by the PALS technique. Regarding the lipoplexes, many of the nanostructures in Figure 8 show a clear thickening of the walls, this feature being also found for other lipoplexes previously studied by us.<sup>16,25,49</sup> In other words, the thickness of nanostructures seen is clearly higher than that reported for a typical lipid bilayer of the mixed liposomes. This thickening may be attributed to the formation of multilamellar complexes constituted by a series of lipid bilayers with pDNA superficially compacted and sandwiched between bilayers, showing a typical fingerprint pattern. Some of those multilamellar structures were chosen to analyze the presence of possible patterns of periodicity that would confirm the regular arrangements of the

multilamellae. These selected micrographs were analyzed with the image processing protocol explained in the Experimental Section. The figure also shows how the presence of pDNA induces liposomal aggregation, leading to the formation of cluster-like nanostructures, where the liposomes are deformed at the surface of the contact with the adjacent liposomes.

Figure 9 shows a plot of gray levels vs distance for the  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes at  $\alpha = 0.5$ , as an example



**Figure 9.** Details extracted from the original cryo-TEM micrographs of  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA at  $\alpha = 0.5$  and  $\rho_{\text{eff}} = 15.7$ . A square is drawn through a desired section of the image and a plot of the gray level vs distance according to the square of the resulting 2D image is shown.

(the same protocol was applied for each of the lipoplexes studied herein). As can be seen, a complex profile with several peaks indicates the presence of several layers. The maximum and minimum levels of density revealed a clear periodic pattern, the average distance between the peaks being measured for each image. Averaged interlamellar spacings of  $5.0 \pm 0.2$ ,  $5.1 \pm 0.2$ ,  $4.8 \pm 0.2$ , and  $4.8 \pm 0.2$  nm were obtained for  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA ( $n = 2, 3, 5$ , or  $12$ ), confirming the compaction of pDNA on a multilamellar sandwiched structure. It may be concluded that the interlamellar spacing is roughly constant within the experimental uncertainty, as long as the spacer on the gemini lipid increases, and its average value ( $\sim 4.9$  nm) is around 15% lower than the value of  $d_{100}$  calculated from the SAXS diffractograms for the  $L_{\alpha,\text{main}}$  structure of  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes, although the SAXS results are much more precise in this respect.

**Transfection Studies.** Efficiency of transfection of pDNA mediated by mixed lipids  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$  ( $n = 2, 3, 5$ , or  $12$ ) were performed both in absence (-FBS-FBS) and presence (-FBS+FBS) of serum using pEGFP-C3 plasmid DNA across HEK293T cells. This study covers the entire range of CL composition,  $\alpha$ , and the effective charge ratio,  $\rho_{\text{eff}}$ , of the lipoplexes which transfect different extent of pEGFP-C3 gene for the expression of the GFP protein. The results were obtained using a flow assisted cell sorting (FACS) method that permits the determination of the proportion of transfected cells as the percentage of the protein (% GFP) and the mean fluorescence intensity (MFI) into the cells.

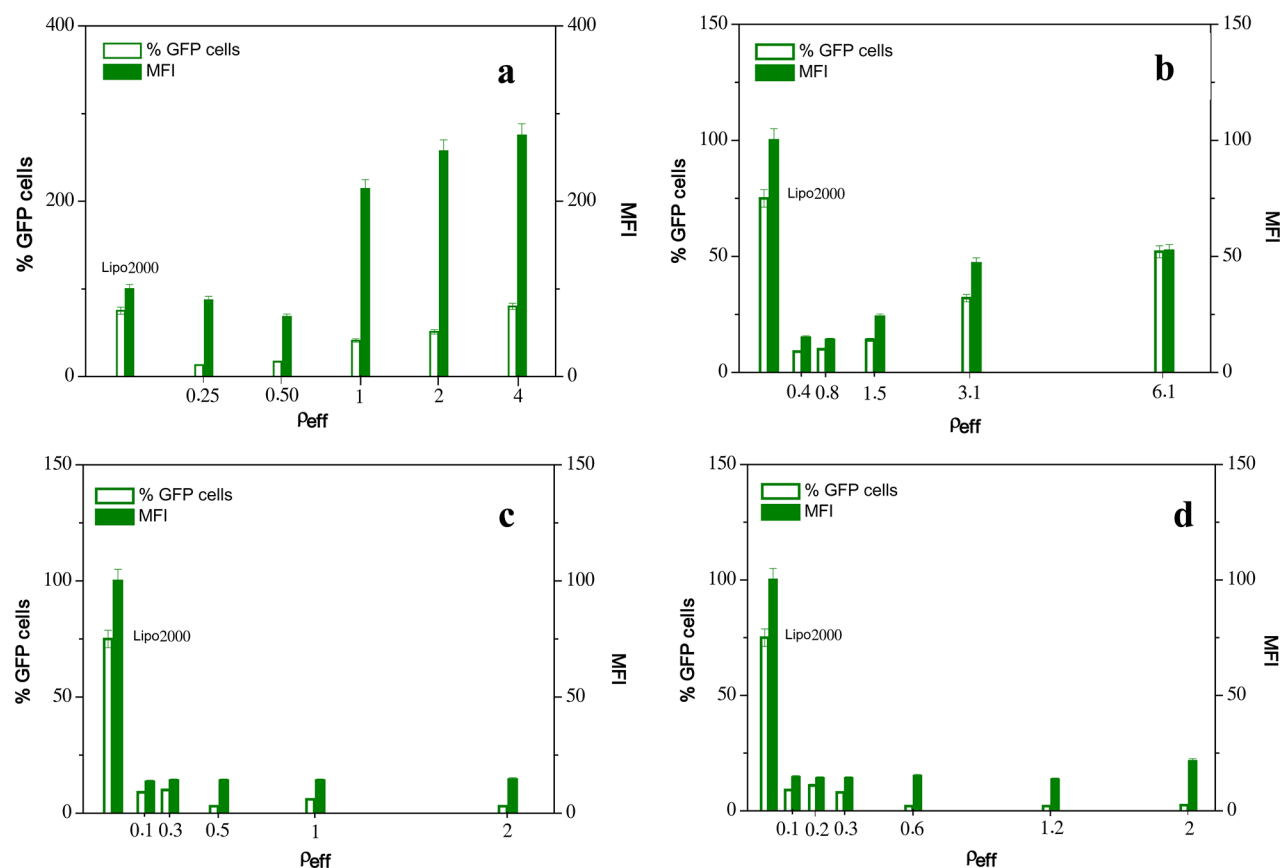
The results of the gene transfection mediated by various lipid mixtures in absence of serum condition (-FBS-FBS) are

presented as  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$  (Figure S-7),  $C_{16}C_3C_{16}/DOPE$  (Figure S-8),  $C_{16}C_5C_{16}/DOPE$  (Figure S-9) and  $C_{16}C_{12}C_{16}/DOPE$  (Figure S-10). Figure S-7 shows that for the mixed lipid system  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$  at  $\alpha = 0.15$  and  $0.25$  none of the formulations ( $\rho_{eff} = 0.07$  to  $2$  and  $0.1$  to  $1.8$ , respectively) were efficient enough to transfect cells to a significant level. However, at  $\alpha = 0.50$  and  $\rho_{eff} = 4$ , the lipid mixture was efficient enough to transfect  $\sim 50\%$  cells with MFI of  $40$ , which further enhanced the transfection efficiency to  $\sim 35\%$  GFP positive cells with MFI  $\sim 150$  at  $\alpha = 0.80$  and  $\rho_{eff} = 2.8$ . Although the % of transfected cells decreased under this condition, the GFP protein expression significantly enhanced as indicated from a  $\sim 3.75$ -fold increase in the MFI. The mixed lipid system  $C_{16}C_3C_{16}/DOPE$  at  $\alpha = 0.15$ ,  $0.25$ , and  $0.5$  and  $\rho_{eff} = 0.07$ – $1.1$ ,  $0.1$ – $1.9$ , and  $0.2$ – $3.8$ , respectively, were not efficient at all for the cell transfection. However, the lipid mixture at  $\rho_{eff} = 2$  and  $\alpha = 0.15$  afforded significant transfection of  $\sim 50\%$  GFP positive cells with a MFI of  $\sim 90$ . Also at  $\alpha = 0.8$ ,  $\rho_{eff} = 1.5$ , this formulation was able to transfect  $\sim 20\%$  cells with a MFI of  $\sim 40$ , which further enhanced the transfection efficiency to  $\sim 40\%$  GFP positive cells with a MFI  $\sim 70$  at  $\rho_{eff} = 6$  (Figure S-8). The mixed lipid system  $C_{16}C_5C_{16}/DOPE$  at  $\alpha = 0.15$ ,  $0.5$ , and  $0.8$  and  $\rho_{eff} = 0.1$ – $2$ ,  $0.3$ – $4$ , and  $0.4$ – $6.3$ , respectively, were not effective at all for transfection, while at  $\alpha = 0.25$ ,  $\rho_{eff} = 1$  this lipid mixture transfected  $\sim 25\%$  cells with a MFI of  $\sim 90$  which further enhanced the transfection efficiency to  $\sim 35\%$  GFP positive cells with a MFI  $\sim 90$  at  $\rho_{eff} = 2$  (Figure S-9). The mixed lipid system  $C_{16}C_{12}C_{16}/DOPE$  at  $\alpha = 0.5$  and  $0.8$  and  $\rho_{eff} = 0.2$  to  $2.3$  and  $0.2$  to  $3.6$ , respectively, did not practically

transfect at all. However, at  $\alpha = 0.15$ ,  $\rho_{eff} = 1.2$  the formulations transfected  $\sim 25\%$  cells with a MFI of  $\sim 100$ , which further enhanced the transfection efficiency to  $\sim 35\%$  GFP positive cells with a MFI  $\sim 175$  at  $\alpha = 0.25$ ,  $\rho_{eff} = 1.2$  (Figure S-10).

Thus, the transfection efficiency of the lipoplexes formed by the  $C_{16}C_nC_{16}$  geminis follow the trend in the absence of serum (-FBS-FBS) as given by  $C_{16}C_2C_{16}$  ( $\alpha = 0.5$ ,  $\rho_{eff} = 4$ )  $>$   $C_{16}C_3C_{16}$  ( $\alpha = 0.8$ ,  $\rho_{eff} = 6$ )  $>$   $C_{16}C_5C_{16}$  ( $\alpha = 0.25$ ,  $\rho_{eff} = 1$ )  $>$   $C_{16}C_{12}C_{16}$  ( $\alpha = 0.25$ ,  $\rho_{eff} = 1$ ) being  $50$ ,  $40$ ,  $35$ , and  $30\%$  of GFP positive cells with MFI of  $40$ ,  $70$ ,  $90$ , and  $175$ , respectively (Table S-5). Thus, the length of the spacer in the gemini CL plays a crucial role in determining the transfection efficiency. Lipofectamine2000, a commercial gene delivery reagent was used as a positive control using the manufacturer's protocol, which could transfect  $\sim 75\%$  with a MFI of  $\sim 100$ .

The transfection efficiency of the CL/DOPE mixtures on addition of FBS during incubation of the lipoplexes (-FBS+FBS) was also measured using HEK293T cells, at the CL compositions,  $\alpha$ , where the highest transfection efficiency in absence of serum was observed (Figure 10) as it is more relevant for transfection in vivo. It was found that only formulations  $C_{16}C_2C_{16}$  ( $\alpha = 0.5$ ,  $\rho_{eff} = 4$ ) and  $C_{16}C_3C_{16}$  ( $\alpha = 0.8$ ,  $\rho_{eff} = 6$ ) could transfect the cells to a significant level of  $\sim 80\%$  GFP positive cells with MFI of  $\sim 275$  and  $\sim 50\%$  GFP positive cells with a MFI of  $\sim 50$ , respectively (Table S-5). It appears that the anionic serum proteins compete with the pDNA more efficiently during the gene transfection mediated by the lipoplexes containing geminis with longer spacers. In the presence of serum,  $C_{16}C_2C_{16}$

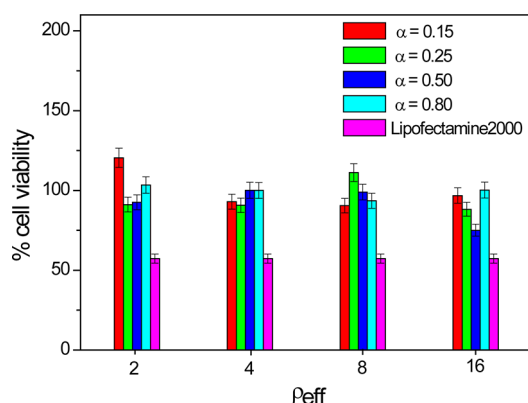


**Figure 10.** Transfection efficiency (% GFP cells and MFI) of pEGFP-C3 plasmid DNA using  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes in HEK293T cells against  $\rho_{eff}$  at the CL compositions,  $\alpha$ , where the highest transfection efficiency in absence of serum was observed: (a)  $n = 2$  ( $\alpha = 0.50$ ); (b)  $n = 3$  ( $\alpha = 0.80$ ); (c)  $n = 5$  ( $\alpha = 0.25$ ); and (d)  $n = 12$  ( $\alpha = 0.25$ ). Also included are the results for Lipofectamine2000–pEGFP-C3 plasmid DNA complexes as a control. Experiments were performed in presence of 10% serum (-FBS+FBS).

( $\alpha = 0.5$ ,  $\rho_{\text{eff}} = 4$ ) based formulation was found to be especially efficient and even better than Lipofectamine2000, a potent commercial gene delivery reagent used as a positive control, which could transfect only  $\sim 75\%$  with a MFI of  $\sim 100$ .

The optimized formulation  $C_{16}C_2C_{16}/\text{DOPE}$  ( $\alpha = 0.5$ ) was further used to transfect four other cell lines of different origins and this afforded significant levels of the transfection efficiency (Figure S-11). In case of the H460 and CHO cells the transfection efficiency, at  $\rho_{\text{eff}} = 4$ , was found to be substantially better than that of Lipofectamine2000 in the presence of 10% serum (Figure S-11). In the case of other cells, the efficacy of transfection of the formulation  $C_{16}C_2C_{16}/\text{DOPE}$  was at least comparable to that of the commercial agent.

**Cell Viability Studies.** To find out the biocompatibility of all the mixed lipid lipoplexes at different  $\alpha$  values with various  $\rho_{\text{eff}}$  MTT assay experiments were performed on HEK293T cells. MTT assay gave the percentage of cells that remained viable to grow and divide after the lipoplex delivery in cells 48 h post transfection. Results were compared with Lipofectamine2000 as a positive control. Figures 11 and S-12 show the cell viability



**Figure 11.** Cytotoxicity assay (MTT assay) of  $C_{16}C_2C_{16}/\text{DOPE}$ -pDNA vs  $\rho_{\text{eff}}$  at several CL compositions,  $\alpha$ . Also shown is the cytotoxicity by Lipofectamine2000, as a control.

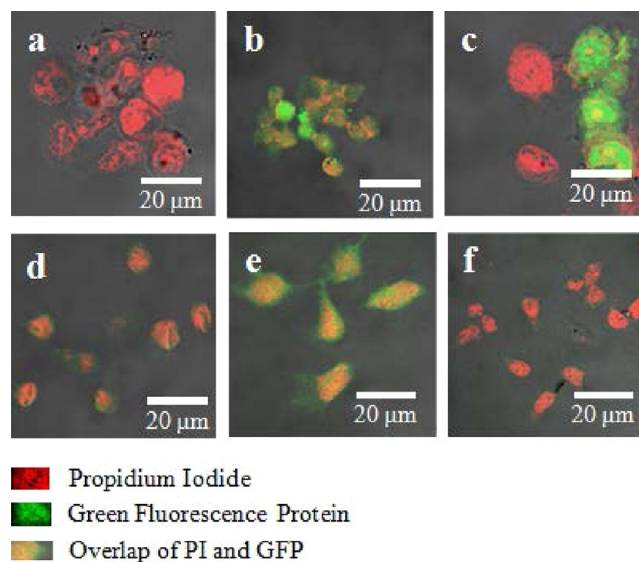
results for  $C_{16}C_nC_{16}/\text{DOPE}$ -pDNA and Lipofectamine2000-pDNA lipoplexes. The plots clearly indicate that all gemini CLs are less toxic than Lipofectamine2000 at any CL composition,  $\alpha$ , and at any effective charge ratio,  $\rho_{\text{eff}}$ .

In any case, at the effective charge ratio appropriate for transfection ( $\rho_{\text{eff}} > 1$ ), the toxicity of the lipoplexes formed by the  $C_{16}C_nC_{16}$  gemini surfactants follows the trend:  $C_{16}C_2C_{16}$  ( $\alpha = 0.5$ )  $<$   $C_{16}C_5C_{16}$  ( $\alpha = 0.25$ )  $<$   $C_{16}C_3C_{16}$  ( $\alpha = 0.8$ )  $<$   $C_{16}C_{12}C_{16}$  ( $\alpha = 0.25$ ). The lower toxicity results in greater % of GFP positive cells with high MFI. A high MFI value indicates high GFP protein expression per cell, which occurred because of the high copy number of pDNA transfected, transcribed, and translated per cell. As the % of CL in the lipoplexes increases, the cytotoxicity also rises a bit. However, the cytotoxicity data clearly suggest that irrespective of the range of CL composition ( $\alpha$  and  $\rho_{\text{eff}}$ ) used for the transfection, the toxicity manifested by each cationic gemini-DOPE lipid mixture is significantly lower than that of Lipofectamine2000. Overall, the gemini-DOPE mixed formulations are highly biocompatible and appear to be safe for the use in vitro transformed cancer cell culture and may be extended for the gene therapy studies in vivo, too.

**Confocal Fluorescence Microscopy.** To visualize the level of GFP expression inside the cells, confocal microscopic investigations of cells were undertaken 48 h post-transfection.

It ensured that the measurement of all the fluorescence by FACS technique was not due to any false positive but owing to the GFP expression mediated by CL DOPE mixed lipid vectors as well as by Lipofectamine2000.

Figures 12 and S-13 present selected confocal micrographs for the lipoplexes prepared from  $C_{16}C_nC_{16}/\text{DOPE}$ -pDNA and



**Figure 12.** Confocal fluorescence microscopy of  $C_{16}C_nC_{16}/\text{DOPE}$ -pDNA ( $n = 2, 3, 5$ , or  $12$ ) transfected HEK293T cells, at  $\alpha = 0.5$  and  $\rho_{\text{eff}} = 2$ , in the presence of serum (-FBS+FBS). Images show the GFP expression in cells after being transfected with (a) cells only; (b) Lipofectamine2000; (c)  $C_{16}C_2C_{16}/\text{DOPE}$ -pDNA; (d)  $C_{16}C_3C_{16}/\text{DOPE}$ -pDNA; (e)  $C_{16}C_5C_{16}/\text{DOPE}$ -pDNA; and (f)  $C_{16}C_{12}C_{16}/\text{DOPE}$ -pDNA.

Lipofectamine2000-pDNA complexes. Nucleus has been stained (red color) with propidium iodide (PI) due to the presence of endogenous DNA present in cells to begin with. On the other hand, the green color in the micrographs implies the presence of GFP into the cell. Orange color originates due to the overlapping of PI and GFP in cellular systems owing to the presence of both the DNA and the GFP. A higher expression of GFP correlates with an enhanced intensity of the green colored protein present in the cellular system.

Based on the previous color assignments, one can deduce from the micrographs that the transfection efficiency of the lipoplexes formed by the  $C_{16}C_nC_{16}$  gemini surfactants follow the trend as given below. The fluorescence intensities due to the GFP expressed by various lipoplexes, at  $\alpha = 0.5$ , followed the order  $C_{16}C_2C_{16} > C_{16}C_5C_{16} > C_{16}C_3C_{16} > C_{16}C_{12}C_{16}$ . These observations are consistent with both the flow cytometry (FACS) data and the cell viability assay. It may be further noticed that the spacer length has a marked effect on the cell size; thus, cells shrink to a lower size following the above-mentioned trends. This may imply an enhanced level of cytotoxicity. In any case, the maximum difference in cell size before and after transfection was seen in the case of Lipofectamine2000, which also correlates well with the cell viability assay.

## CONCLUSIONS

The study confirms that in the presence of lipid mixtures formed by cationic geminis ( $C_{16}C_nC_{16}$ , where  $n = 2, 3, 5$ , or  $12$ ) and zwitterionic DOPE as helper lipid, plasmid DNA is compacted



with a large number of its  $\text{Na}^+$  counterions. These pDNA alkali metal ions are not released when the lipoplex is formed, thus, yielding a much lower effective negative charge ( $q_{\text{pDNA}}^- = -0.45$ ). Such a value has been experimentally determined from the zeta potential measurements and confirmed by gel electrophoresis and biological transfection studies. Thus, a lower amount of CL is needed to form cationic lipoplexes of appropriate effective charge ratio,  $\rho_{\text{eff}}$  for transfecting pDNA to living cells. This finding, also confirmed in this work from the in vitro transfection studies, is very significant because for an effective pDNA transfection, the minimum the amount of the CL, the lower is the cytotoxicity.

In addition, depending on the cationic lipid composition,  $\alpha$ , of the lipid mixtures, and the effective charge ratios of the lipoplexes,  $\rho_{\text{eff}}$  the reported SAXS experiments indicate the presence of two or three structures in the same lipoplex, one in the DOPE-rich region, other in the CL-rich region, and another one present at any CL composition. Cryo-TEM and SAXS results for  $\text{C}_{16}\text{C}_n\text{C}_{16}/\text{DOPE-pDNA}$  lipoplexes indicate that pDNA is compacted and sandwiched between the mixed lipid bilayer of lamellar structures within a monolayer of  $\sim 2$  nm, consistent with a highly compacted pDNA conformation compared with the linear ctDNA. Transfection and cytotoxicity results indicate that the cationic lipid composition,  $\alpha$ , the effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$  and mainly the length of the spacer in the cationic gemini surfactant play a key role in determining an optimum transfection efficiency. Cytotoxicity experiments indicate that these CL/DOPE mixtures are quite biocompatible leaving  $\sim 95\%$  cells viable. A significantly high percentage ( $\sim 80\%$ ) of the transformed cancer cells HEK293T were transfected with a high MFI value of  $\sim 275$  using gemini CL ( $\text{C}_{16}\text{C}_2\text{C}_{16}$ ) at  $\alpha = 0.5$  and  $\rho_{\text{eff}} = 4$  in presence of 10% serum ( $-\text{FBS}+\text{FBS}$ ). This was also true in case of cells from other origins, for example, H460, CHO, HeLa, and U343. These results have been corroborated by the confocal fluorescence microscopy, which probes the existence of GFP protein inside the cells expressed after transfection with pEGFP-C3 plasmid DNA, using various CL/DOPE mixtures in the absence ( $-\text{FBS}-\text{FBS}$ ) and presence of serum ( $-\text{FBS}+\text{FBS}$ ). Gemini CLs with short spacer ( $n = 2$  or  $3$ ) afforded higher transfection efficiency, probably due to the presence of two coexisting lamellar structures in such lipoplexes. Coexisting lamellar structures were abundant in the lipoplexes with the geminis of short spacer CL ( $n = 2, 3$ ) rather than the ones with the long spacer ( $n = 5, 12$ ). The larger charge density and lower hydrophobicity of the headgroup might have played a role. The findings of this work should therefore enrich the knowledge pertaining to the interaction between the CL and plasmid DNA, from a quantitative point of view. This thereby provides fundamental information that permits the determination of the optimized lipoplex formulations. This guarantees full DNA protection with the minimum amount of CL vector necessary for efficient gene therapy.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Additional results. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Fax: +918023600529 (S.B.); +34913944135 (E.A.). E-mail: sb@orgchem.iisc.ernet.in (S.B.); aicart@quim.ucm.es (E.A.).

### Author Contributions

<sup>†</sup>These authors contributed equally.

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank MICINN of Spain (projects no. CTQ2009-10002BQU and ACI2009-0867), DST of India (project no. DST/INT/SPAIN/P-8/2009 and DST for J. C. Bose fellowship to S.B.), and Univ. Complutense of Madrid (Spain) (projects no. UCMA05-33-010 and GR35/10-A). Authors also thank BM16-CRG/Consorci Laboratori Llum Sincrotró (LLS) at ESRF, Grenoble (France), and F. Fauth for assistance with SAXS studies, and to Servei de Microscopia of Univ. Autònoma of Barcelona (Spain) for cryo-TEM experiments.

## ■ REFERENCES

- (1) Ewert, K.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Lin, A. J.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 133–149.
- (2) Leal, C.; Bouxsein, N. F.; Ewert, K. K.; Safinya, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16841–16847.
- (3) Shirazi, R. S.; Ewert, K. K.; Leal, C.; Majzoub, R. N.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 2156–2166.
- (4) Verma, I. M.; Weitzman, M. D. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 711–738.
- (5) Koynova, R.; MacDonald, R. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2373–2382.
- (6) Montier, T.; Benvegnu, T.; Jaffres, P. A.; Yaouanc, J. J.; Lehn, P. *Curr. Gene Ther.* **2008**, *8*, 296–312.
- (7) Wasungu, L.; Hoekstra, D. J. *Controlled Release* **2006**, *116*, 255–264.
- (8) Dias, R. S.; Lindman, B. *DNA Interaction with Polymers and Surfactants*; Wiley and Sons: Hoboken, 2008.
- (9) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7764–7777.
- (10) Bhattacharya, S.; Bajaj, A. *Chem. Commun.* **2009**, 4632–4656.
- (11) Caracciolo, G.; Marchini, C.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Amenitsch, H.; Montani, M.; Amici, A. *Langmuir* **2007**, *23*, 4498–4508.
- (12) Tiera, M. J.; Shi, Q.; Winnik, F. M.; Fernandes, J. C. *Curr. Gene Ther.* **2011**, *11*, 288–306.
- (13) Eisele, K.; Gropeanu, R. A.; Zehendner, C. M.; Rouhanipour, A.; Ramanathan, A.; Mihov, G.; Koynov, K.; Kuhlmann, C. R. W.; Vasudevan, S. G.; Luhmann, H. J.; Weil, T. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8789–8801.
- (14) Mustapa, M. F. M.; Grosse, S. M.; Kudsiova, L.; Elbs, M.; Raiber, E. A.; Wong, J. B.; Brain, A. P. R.; Armer, H. E. J.; Warley, A.; Keppler, M.; Ng, T.; Lawrence, M. J.; Hart, S. L.; Hailes, H. C.; Tabor, A. B. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 518–532.
- (15) Chen, J.; Tian, B.; Yin, X.; Zhang, Y. P.; Hu, D.; Hu, Z.; Liu, M.; Pan, Y.; Zhao, J.; Li, H.; Hou, C.; Wang, J.; Zhang, Y. P. *J. Biotechnol.* **2007**, *130*, 107–113.
- (16) Rodriguez-Pulido, A.; Martin-Molina, A.; Rodriguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648–15661.
- (17) Muñoz-Úbeda, M.; Misra, S. K.; Barrán-Berdón, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Sierra, M. B.; Biswas, J.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18014–18017.
- (18) Rädler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Science* **1997**, *275*, 810–814.
- (19) Bajaj, A.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 991–999.
- (20) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Amenitsch, H.; Caminiti, R. *Langmuir* **2005**, *21*, 11582–11587.
- (21) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Marchini, C.; Montani, M.; Amici, A.; Amenitsch, H. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 11298–11304.
- (22) Ciani, L.; Ristori, S.; Calamai, L.; Martini, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1664*, 70–79.
- (23) Tarahovsky, Y. S.; Rakhmanova, V. A.; Epand, R. M.; MacDonald, R. C. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 264–273.

- (24) Ryhänen, S. J.; Säily, M. J.; Paukku, T.; Borocci, S.; Mancini, G.; Holopainen, J. M.; Kinnunen, P. K. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 578–587.
- (25) Muñoz-Ubeda, M.; Rodríguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Llorca, O.; Quesada-Perez, M.; Martín-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Soft Matter* **2011**, *7*, 5991–6004.
- (26) Ma, B. C.; Zhang, S. B.; Jiang, H. M.; Zhao, B. D.; Lv, H. T. *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 184–194.
- (27) Farago, O.; Gronbech-Jensen, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2875–2881.
- (28) Farago, O.; Gronbech-Jensen, N. *Soft Matter* **2011**, *7*, 4302–4306.
- (29) Lasic, D. D. *Liposomes in Gene Delivery*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- (30) Ewert, K. K.; Evans, H. M.; Zidovska, A.; Boussein, N. F.; Ahmad, A.; Safinya, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3998–4006.
- (31) De, S.; Aswal, V. K.; Goyal, P. S.; Bhattacharya, S. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 11664–11671.
- (32) Rodríguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Llorca, O.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2187–2197.
- (33) Barreleiro, P. C. A.; Lindman, B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6208–6213.
- (34) Mel'nikov, S. M.; Lindman, B. *Langmuir* **1999**, *15*, 1923–1928.
- (35) Muñoz-Ubeda, M.; Rodríguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Martín-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3332–3340.
- (36) Delgado, A. V. *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*; Marcel Dekker: New York, 2002; Vol. 106.
- (37) Ohshima, H.; Furusawa, K. *Electrical Phenomena at Interfaces. Fundamentals, Measurements, and Applications*; Marcel Dekker: New York, 1998.
- (38) Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. Q. *Rev. Biophys.* **1988**, *21*, 129–228.
- (39) Bednar, J.; Woodcock, C. L. *Chromatin*; Academic Press, Inc.: San Diego, CA, 1999; Vol. 304, p 191–213.
- (40) Dubochet, J.; Zuber, B.; Eltsov, M.; Bouchet-Marquis, C.; Al-Amoudi, A.; Livolant, F. In *Cellular Electron Microscopy*; Academic Press: New York, 2007; Vol. 79, pp 385–406.
- (41) Bajaj, A.; Paul, B.; Indi, S. S.; Kondiah, P.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 2144–2158.
- (42) Bajaj, A.; Kondiah, P.; Bhattacharya, S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2432–2442.
- (43) Caracciolo, G.; Pozzi, D.; Amici, A.; Amenitsch, H. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 2028–2032.
- (44) Marchini, C.; Montani, M.; Amici, A.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Caracciolo, G. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *94*, 033903.
- (45) Safinya, C. R.; Ewert, K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Raviv, U.; Needleman, D. J.; Lin, A. J.; Slack, N. L.; George, C.; Samuel, C. E. *Philos. Trans. R. Soc., A* **2006**, *364*, 2573–2596.
- (46) Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 915–924.
- (47) Zidovska, A.; Evans, H. M.; Ewert, K. K.; Quispe, J.; Carragher, B.; Potter, C. S.; Safinya, C. R. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 3694–3703.
- (48) Farago, O.; Ewert, K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Gronbech-Jensen, N.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 836–846.
- (49) Rodríguez-Pulido, A.; Ortega, F.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12555–12565.

## Supporting Information for

# How Does Spacer Length of Cationic Gemini Lipids Influence the Lipoplex Formation with Plasmid DNA? Physicochemical and Biochemical Characterizations and Their Relevance in Gene Therapy

Mónica Muñoz-Úbeda,<sup>†,‡</sup> Santosh K. Misra,<sup>§,‡</sup> Ana L. Barrán-Berdón,<sup>†</sup> Sougata Datta,<sup>§</sup>  
Clara Aicart-Ramos,<sup>||</sup> Pablo Castro-Hartmann,<sup>⊥</sup> Paturu Kondaiah,<sup>#</sup> Elena Junquera,<sup>†</sup>  
Santanu Bhattacharya,<sup>\*,§</sup> and Emilio Aicart<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, and

<sup>||</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas,

Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Departments of <sup>§</sup>Organic Chemistry, and <sup>#</sup>Molecular Reproduction Development and  
Genetics, Indian Institute of Science, 560012 Bangalore, India

<sup>⊥</sup>Servei de Microscopia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del  
Vallés, Spain

\*Authors to whom the correspondence should be addressed:

Santanu Bhattacharya: Fax: +918023600529. e-mail: [sb@orgchem.iisc.ernet.in](mailto:sb@orgchem.iisc.ernet.in)

Emilio Aicart: Fax: +34913944135. e-mail: [aicart@quim.ucm.es](mailto:aicart@quim.ucm.es)

**Chemical shifts,  $\delta$ , in ppm downfield from the internal standard (TMS) and pertinent details of the synthesized gemini lipids.**

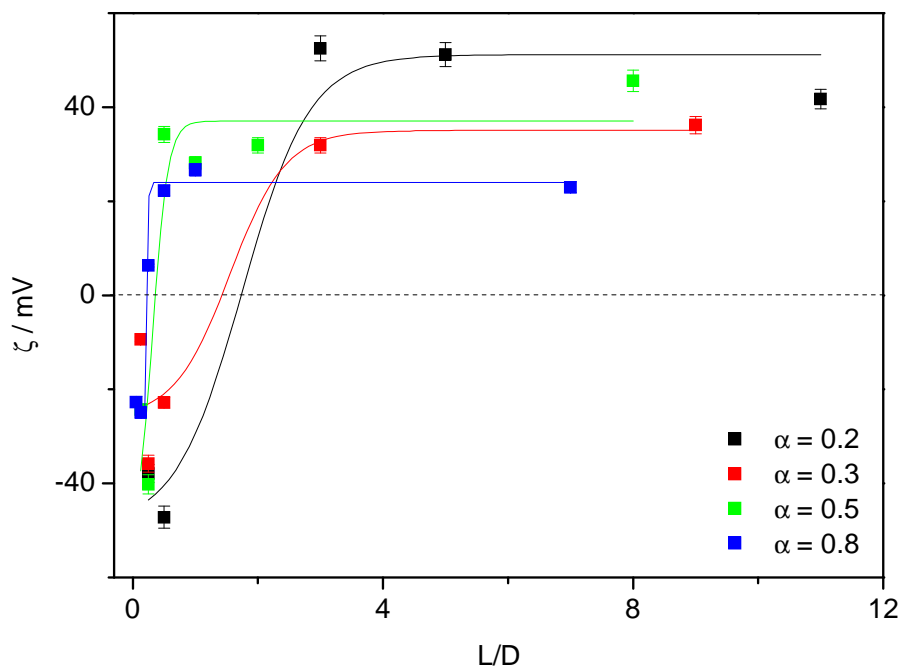
*Bis(hexadecyl dimethylammonium)ethane* ( $C_{16}C_2C_{16}$ ).  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ 0.87 (t, 6H, alkyl chain  $2 \times CH_3$ ), 1.24-1.40 (br m, 52H, alkyl chain  $2 \times 13 CH_2$ ), 1.75 (br s, 4H, alkyl chain  $2 \times CH_2CH_2N^+$ ), 2.64 (br s, 2H, spacer chain  $1 \times CH_2CH_2N^+$ ), 3.51 (s, 12H,  $2 \times 2 N^+CH_3$ ), 3.68 - 3.72 (m, 4H, alkyl chain  $2 \times CH_2N^+$ ), 4.81 (s, 4H, spacer chain  $2 \times CH_2N^+$ ). Anal. Calcd. for  $C_{38}H_{82}N_2Br_2 \cdot 2.0 H_2O$ : C, 59.83; H, 11.36; N, 3.67. Found C, 60.12; H, 11.48; N, 3.43.

*Bis(hexadecyl dimethylammonium)propane* ( $C_{16}C_3C_{16}$ ).  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ 0.87 (t, 6 H, alkyl chain  $2 \times CH_3$ ), 1.24-1.40 (br m, 52H, alkyl chain  $2 \times 13 CH_2$ ), 1.75 (br s, 4 H, alkyl chain  $2 \times CH_2CH_2N^+$ ), 2.64 (br s, 2H, spacer chain  $1 \times 1 CH_2CH_2N^+$ ), 3.36 (s, 12 H,  $2 \times 2 N^+CH_3$ ), 3.46 (m, 4H, alkyl chain  $2 \times CH_2N^+$ ), 3.77 (m, 4 H, spacer chain  $2 \times CH_2N^+$ ). Anal. Calcd. for  $C_{39}H_{84}N_2Br_2 \cdot 2.0 H_2O$ : C, 60.29; H, 11.42; N, 3.60. Found C, 60.02; H, 11.38; N, 3.33.

*Bis(hexadecyl dimethylammonium)pentane* ( $C_{16}C_5C_{16}$ ).  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ 0.88 (t, 6 H, alkyl chain  $2 \times CH_3$ ), 1.15-1.45 (br m, 42H, alkyl chain  $2 \times 10 CH_2$  and spacer chain  $CH_2$ ), 1.68 (crude t, 16H, alkyl chain  $2 \times 4 CH_2$ ), 2.02-2.20 (br m, 4H, spacer chain  $1 \times 2 CH_2CH_2N^+$ ), 3.33 (s, 12H,  $2 \times 2 N^+CH_3$ ), 3.45 (crude t, 4H, alkyl chain  $2 \times CH_2N^+$ ), 3.90 (crude t, 4H, spacer chain  $1 \times 2 CH_2N^+$ ). Anal. Calcd. for  $C_{41}H_{88}N_2Br_2$ : C, 64.04; H, 11.54; N, 3.64. Found C, 64.23; H, 11.72; N, 3.47.

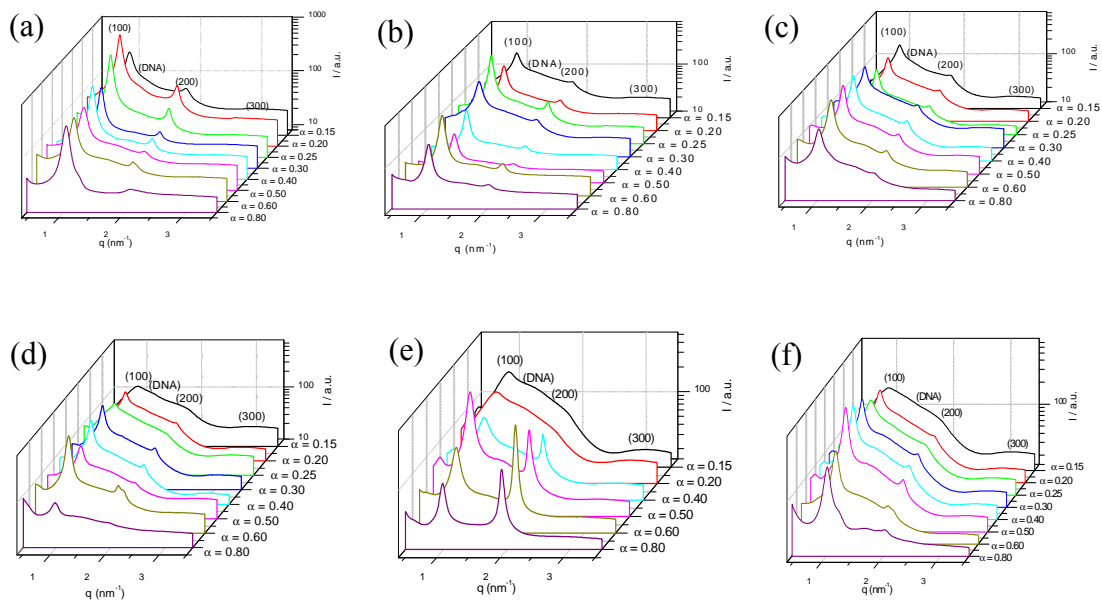
*Bis(hexadecyl dimethylammonium)dodecane* ( $C_{16}C_{12}C_{16}$ ).  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ 0.88 (t, 6H, alkyl chain  $2 \times CH_3$ ), 1.25- 1.38 (s + br m, 68H, alkyl chain  $2 \times 13 CH_2$  and spacer chain  $1 \times 8 CH_2$ ), 1.65-1.85 (br m, 8H, spacer chain  $1 \times 2 CH_2CH_2N^+$  and alkyl chain  $2 \times CH_2CH_2N^+$ ), 3.38 (s, 12H,  $2 \times 2 N^+CH_3$ ), 3.44-3.54 (m, 4H, alkyl chain  $2 \times CH_2N^+$ ), 3.64-3.74 (m, 4H, spacer chain  $1 \times 2 CH_2N^+$ ). Anal. Calcd.

for  $C_{48}H_{102}N_2Br_2$ ,  $0.5H_2O$ : C, 65.80; H, 11.85; N, 3.20. Found C, 66.09; H, 12.09; N, 3.05.

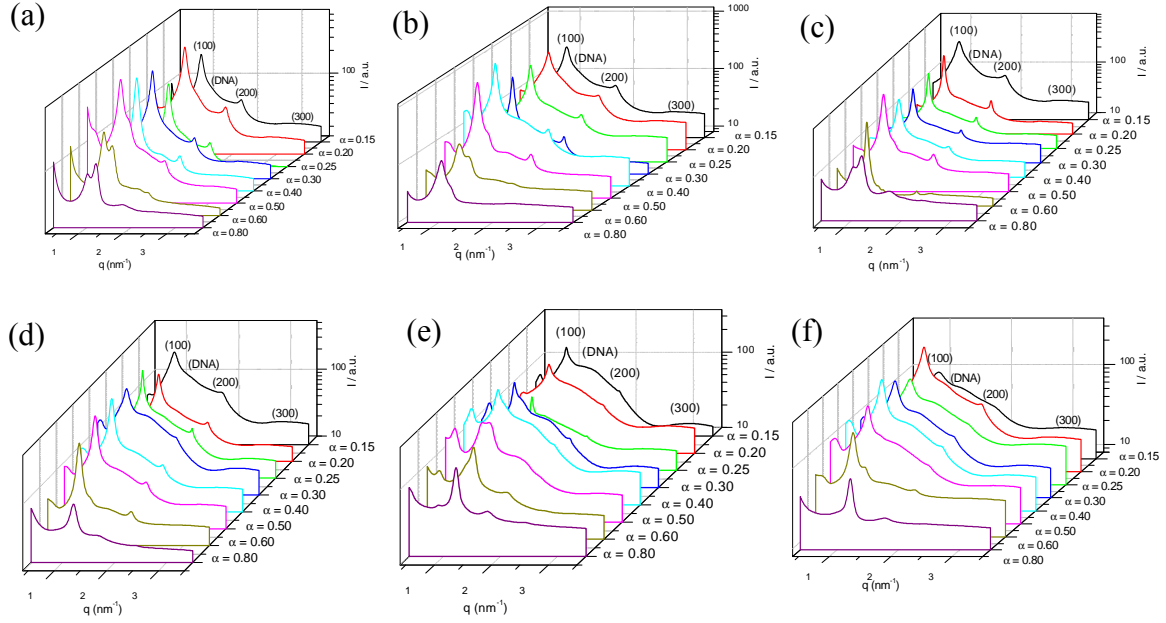


**Figure S-1.** Plots of zeta potential,  $\zeta$ , against the lipoplex composition ( $L/D$ ) of  $C_{16}C_3C_{16}/DOPE$ -pDNA at different CL composition,  $\alpha$ , in HEPES buffer at 298.15 K, pH = 7.4. Solid line: sigmoidal fit of experimental values. Errors are within  $\pm 5\%$ ,  $[DNA] = 0.1$  mg/mL and  $[L]$  was varied, depending on the CL composition, to cover a wide  $L/D$  range.

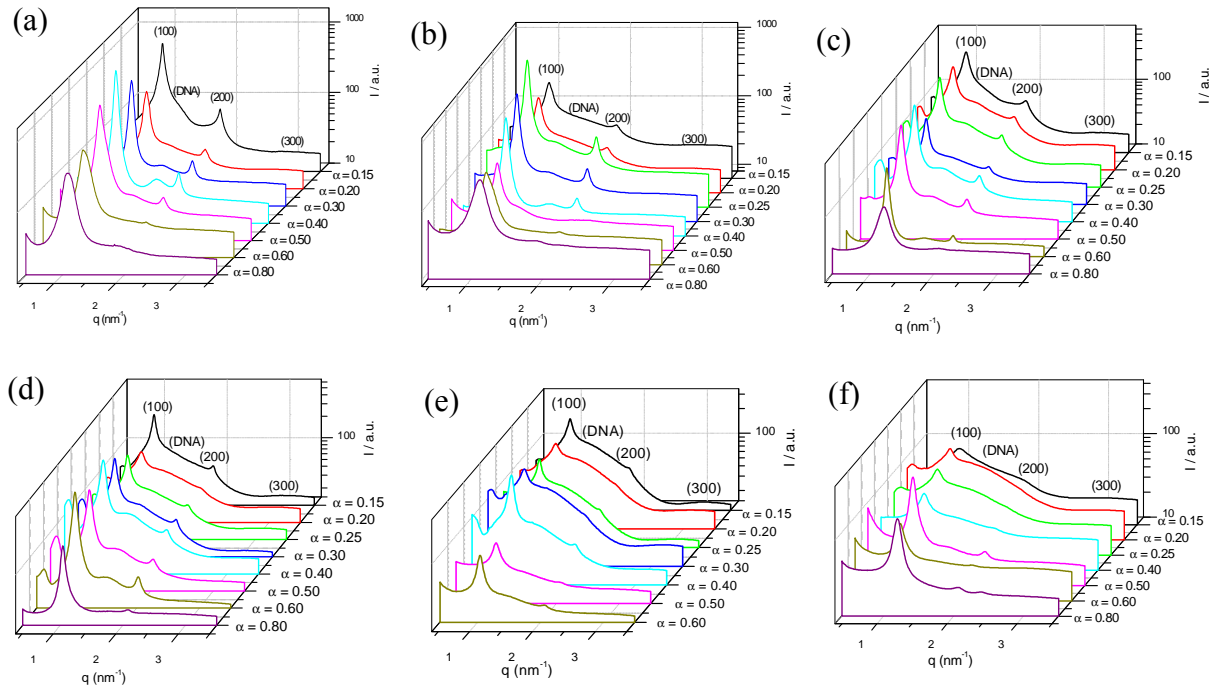




**Figure S-2.** SAXS diffractograms of the  $C_{16}C_3C_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes at several CL compositions,  $\alpha$ , and effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}}$ ): (a)  $\rho_{\text{eff}} = 2.2$ , (b)  $\rho_{\text{eff}} = 4.4$ , (c)  $\rho_{\text{eff}} = 6.5$ , (d)  $\rho_{\text{eff}} = 8.7$ , (e)  $\rho_{\text{eff}} = 10.9$  and (f)  $\rho_{\text{eff}} = 13.1$ .



**Figure S-3.** SAXS diffractograms of the  $C_{16}C_5C_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes at several CL compositions,  $\alpha$ , and effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$ : (a)  $\rho_{\text{eff}} = 2.3$ , (b)  $\rho_{\text{eff}} = 4.7$ , (c)  $\rho_{\text{eff}} = 7.0$ , (d)  $\rho_{\text{eff}} = 9.3$ , (e)  $\rho_{\text{eff}} = 11.6$  and (f)  $\rho_{\text{eff}} = 14.0$ .



**Figure S-4.** SAXS diffractograms of the  $C_{16}C_{12}C_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes at several CL compositions,  $\alpha$ , and effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$ : (a)  $\rho_{\text{eff}} = 1.5$ , (b)  $\rho_{\text{eff}} = 2.9$ , (c)  $\rho_{\text{eff}} = 4.4$ , (d)  $\rho_{\text{eff}} = 5.8$ , (e)  $\rho_{\text{eff}} = 7.3$  and (f)  $\rho_{\text{eff}} = 8.7$ .

**Table S-1. Values of  $q_{100}$ ,  $d_{100}$ ,  $q_{pDNA}$  and  $d_{pDNA}$  of the  $L_\alpha$  lamellar structures found for  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA at several CL compositions,  $\alpha$ , of the mixed lipid and at several effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$**

| $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA |            |           |      |           |      |           |      |           |      |           |      |         |           |      |         |           |      |         |      |             |
|------------------------------|------------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|---------|-----------|------|---------|-----------|------|---------|------|-------------|
|                              |            | $\alpha$  |      |           |      |           |      |           |      |           |      |         |           |      |         |           |      |         |      |             |
| $\rho_{\text{eff}}$          |            | 0.15      |      | 0.20      |      | 0.25      |      | 0.30      |      | 0.40      |      |         | 0.50      |      |         | 0.60      |      |         | 0.80 |             |
|                              |            | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | CL rich | DOPE rich | Main | CL rich | DOPE rich | Main | CL rich | Main | Rich gemini |
| 2.0                          | $q_{100}$  |           | 0.94 | 0.62      | 0.94 | 0.66      | 0.95 | 0.67      | 0.97 | 0.62      | 1.00 |         | 0.63      | 1.01 |         | 0.63      | 1.03 | 1.30    | 1.05 | 1.23        |
|                              | $d_{100}$  |           | 6.68 | 10.13     | 6.68 | 9.52      | 6.61 | 9.38      | 6.48 | 10.13     | 6.28 |         | 9.97      | 6.22 |         | 9.97      | 6.10 | 4.83    | 5.98 | 5.11        |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.25 |           | 1.31 |           | 1.34 |           | 1.46 |           | 1.48 |         |           | 1.54 |         |           | 1.59 |         | 1.71 |             |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 5.03 |           | 4.80 |           | 4.69 |           | 4.30 |           | 4.25 |         |           | 4.08 |         |           | 3.95 |         | 3.67 |             |
| 4.0                          | $q_{100}$  | 0.68      | 0.94 | 0.69      | 0.94 | 0.65      | 0.97 | 0.7       | 0.97 | 0.75      | 0.99 |         | 0.74      | 1.01 |         | 0.75      | 1.04 | 1.22    | 1.04 | 1.23        |
|                              | $d_{100}$  | 9.24      | 6.68 | 9.11      | 6.68 | 9.67      | 6.48 | 8.98      | 6.48 | 8.38      | 6.35 |         | 8.49      | 6.22 |         | 8.38      | 6.04 | 5.15    | 6.04 | 5.11        |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.27 |           | 1.34 |           | 1.48 |           | 1.53 |           | 1.6  |         |           | 1.66 |         |           | 1.75 |         | 1.73 |             |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.95 |           | 4.69 |           | 4.25 |           | 4.11 |           | 3.93 |         |           | 3.79 |         |           | 3.59 |         | 3.63 |             |
| 6.0                          | $q_{100}$  | 0.54      | 0.94 | 0.57      | 0.95 | 0.69      | 0.97 | 0.59      | 0.98 | 0.59      | 1.00 |         | 0.62      | 1.01 |         | 0.65      | 1.02 | 1.24    | 1.04 | 1.22        |
|                              | $d_{100}$  | 11.6      | 6.68 | 11.0      | 6.61 | 9.11      | 6.48 | 10.7      | 6.41 | 10.7      | 6.28 |         | 10.1      | 6.22 |         | 9.67      | 6.16 | 5.07    | 6.04 | 5.15        |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.28 |           | 1.35 |           | 1.44 |           | 1.53 |           | 1.54 |         |           | 1.65 |         |           | 1.65 |         | 1.68 |             |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.91 |           | 4.65 |           | 4.36 |           | 4.11 |           | 4.08 |         |           | 3.81 |         |           | 3.81 |         | 3.74 |             |
| 8.0                          | $q_{100}$  | 0.61      | 0.94 | 0.63      | 0.95 | 0.66      | 0.95 | 0.63      | 0.97 | 0.59      | 1.01 | 1.33    | 0.60      | 1.01 | 1.31    | 0.56      | 1.03 | 1.31    | 1.03 | 1.31        |
|                              | $d_{100}$  | 10.3      | 6.68 | 9.97      | 6.61 | 9.52      | 6.61 | 9.97      | 6.48 | 10.7      | 6.22 | 4.72    | 10.5      | 6.22 | 4.80    | 11.2      | 6.10 | 4.80    | 6.10 | 4.80        |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.53 |           | 1.33 |           | 1.44 |           | 1.55 |           | 1.56 |         |           | 1.53 |         |           | 1.58 |         | 1.68 |             |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.11 |           | 4.72 |           | 4.36 |           | 4.05 |           | 4.03 |         |           | 4.11 |         |           | 3.98 |         | 3.74 |             |
| 10.0                         | $q_{100}$  | 0.63      | 1.06 | 0.65      | 0.96 | 0.60      | 0.97 | 0.61      | 0.97 | 0.63      | 1.00 | 1.26    | 0.65      | 1.01 | 1.31    | 0.66      | 1.03 | 1.32    | 1.04 | 1.22        |
|                              | $d_{100}$  | 9.97      | 5.93 | 9.67      | 6.54 | 10.47     | 6.48 | 10.30     | 6.48 | 9.97      | 6.28 | 4.99    | 9.67      | 6.22 | 4.80    | 9.52      | 6.10 | 4.76    | 6.04 | 5.15        |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.50 |           | 1.50 |           | 1.42 |           | 1.47 |           | 1.56 |         |           | 1.60 |         |           | 1.69 |         | 1.62 |             |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.19 |           | 4.19 |           | 4.42 |           | 4.27 |           | 4.03 |         |           | 3.93 |         |           | 3.72 |         | 3.88 |             |
| 12.0                         | $q_{100}$  | 0.65      | 0.96 | 0.66      | 0.95 | 0.68      | 0.97 | 0.69      | 0.98 | 0.65      | 0.98 |         | 0.67      | 1.00 |         | 0.64      | 1.01 |         | 1.04 | 1.24        |
|                              | $d_{100}$  | 9.67      | 6.54 | 9.52      | 6.61 | 9.24      | 6.48 | 9.11      | 6.41 | 9.67      | 6.41 |         | 9.38      | 6.28 |         | 9.82      | 6.22 |         | 6.04 | 5.07        |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.48 |           | 1.52 |           | 1.53 |           | 1.62 |           | 1.51 |         |           | 1.53 |         |           | 1.63 |         | 1.6  |             |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.25 |           | 4.13 |           | 4.11 |           | 3.88 |           | 4.16 |         |           | 4.11 |         |           | 3.85 |         | 3.93 |             |

$d$  values in nm;  $q$  values in  $\text{nm}^{-1}$

**Table S-2. Values of  $q_{100}$ ,  $d_{100}$ ,  $q_{pDNA}$  and  $d_{pDNA}$  of the  $L_{\alpha}$  lamellar structures found for  $C_{16}C_3C_{16}/DOPE$ -pDNA at several CL compositions,  $\alpha$ , of the mixed lipid and at several effective charge ratios,  $\rho_{eff}$**

| $C_{16}C_3C_{16}/DOPE$ -pDNA |            |           |      |           |      |           |      |           |      |           |      |           |      |      |      |         |
|------------------------------|------------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|------|------|---------|
|                              |            | $\alpha$  |      |           |      |           |      |           |      |           |      |           |      |      |      |         |
|                              |            | 0.15      |      | 0.20      |      | 0.25      |      | 0.30      |      | 0.40      |      | 0.50      |      | 0.60 | 0.80 |         |
| $\rho_{eff}$                 |            | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | Main | Main | CL rich |
| 2.2                          | $q_{100}$  |           | 0.93 |           | 0.94 | 0.63      | 0.95 | 0.63      | 0.96 | 0.63      | 0.98 |           | 1.01 | 1.01 | 1.04 | 1.25    |
|                              | $d_{100}$  |           | 6.76 |           | 6.68 | 9.97      | 6.61 | 9.97      | 6.54 | 9.97      | 6.41 |           | 6.22 | 6.22 | 6.04 | 5.03    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.25 |           | 1.28 |           | 1.40 |           | 1.49 |           | 1.57 |           | 1.54 | 1.55 | 1.56 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 5.03 |           | 4.91 |           | 4.49 |           | 4.22 |           | 4.00 |           | 4.08 | 4.05 | 4.03 |         |
| 4.4                          | $q_{100}$  | 0.66      | 0.94 | 0.65      | 0.94 | 0.60      | 0.95 | 0.69      | 0.97 | 0.69      | 0.98 |           | 1.00 | 1.02 | 1.03 |         |
|                              | $d_{100}$  | 9.52      | 6.68 | 9.67      | 6.68 | 10.5      | 6.61 | 9.11      | 6.48 | 9.11      | 6.41 |           | 6.28 | 6.16 | 6.10 |         |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.27 |           | 1.36 |           | 1.45 |           | 1.56 |           | 1.50 |           | 1.49 | 1.57 | 1.62 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.95 |           | 4.62 |           | 4.33 |           | 4.03 |           | 4.19 |           | 4.22 | 4.00 | 3.88 |         |
| 6.5                          | $q_{100}$  | 0.54      | 0.94 | 0.55      | 0.95 | 0.59      | 0.97 | 0.77      | 0.97 | 0.77      | 0.98 | 0.62      | 1.02 | 1.03 | 1.02 | 1.22    |
|                              | $d_{100}$  | 11.6      | 6.68 | 11.4      | 6.61 | 10.7      | 6.48 | 8.16      | 6.48 | 8.16      | 6.41 | 10.1      | 6.16 | 6.10 | 6.16 | 5.15    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.24 |           | 1.31 |           | 1.39 |           | 1.48 |           | 1.52 |           | 1.60 | 1.63 | 1.65 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 5.07 |           | 4.80 |           | 4.52 |           | 4.25 |           | 4.13 |           | 3.93 | 3.85 | 3.81 |         |
| 8.7                          | $q_{100}$  | 0.63      | 0.94 | 0.65      | 0.94 | 0.74      | 0.96 | 0.66      | 0.97 | 0.74      | 0.98 | 0.77      | 1.00 | 1.01 | 1.01 |         |
|                              | $d_{100}$  | 9.97      | 6.68 | 9.67      | 6.68 | 8.49      | 6.54 | 9.52      | 6.48 | 8.49      | 6.41 | 8.16      | 6.28 | 6.22 | 6.22 |         |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.26 |           | 1.43 |           | 1.42 |           | 1.48 |           | 1.46 |           | 1.49 | 1.48 | 1.68 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.99 |           | 4.39 |           | 4.42 |           | 4.25 |           | 4.30 |           | 4.22 | 4.25 | 3.74 |         |
| 10.9                         | $q_{100}$  | 0.67      | 0.94 | 0.68      | 0.97 |           | -    |           | -    |           | 0.99 |           | 0.98 | 0.98 | 0.99 |         |
|                              | $d_{100}$  | 9.38      | 6.68 | 9.24      | 6.48 |           | -    |           | -    |           | 6.35 |           | 6.41 | 6.41 | 6.35 |         |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.31 |           | 1.42 |           | -    |           | -    |           | 1.51 |           | 1.51 | 1.51 | 1.50 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.80 |           | 4.42 |           | -    |           | -    |           | 4.16 |           | 4.16 | 4.16 | 4.19 |         |
| 13.1                         | $q_{100}$  | 0.57      | 0.95 | 0.63      | 0.96 | 0.65      | 0.97 | 0.66      | 0.98 | 0.68      | 0.99 | 0.68      | 1.01 | 1.01 | 1.02 | 1.23    |
|                              | $d_{100}$  | 11.0      | 6.61 | 9.97      | 6.54 | 9.67      | 6.48 | 9.52      | 6.41 | 9.24      | 6.35 | 9.24      | 6.22 | 6.22 | 6.16 | 5.11    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.31 |           | 1.36 |           | 1.43 |           | 1.45 |           | 1.48 |           | 1.52 | 1.5  | 1.69 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.80 |           | 4.62 |           | 4.39 |           | 4.33 |           | 4.25 |           | 4.13 | 4.19 | 3.72 |         |

$d$  values in nm;  $q$  values in nm<sup>-1</sup>

**Table S-3. Values of  $q_{100}$ ,  $d_{100}$ ,  $q_{pDNA}$  and  $d_{pDNA}$  of the  $L_\alpha$  lamellar structures found for  $C_{16}C_5C_{16}$ /DOPE-pDNA at several CL compositions,  $\alpha$ , of the mixed lipid and at several effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$**

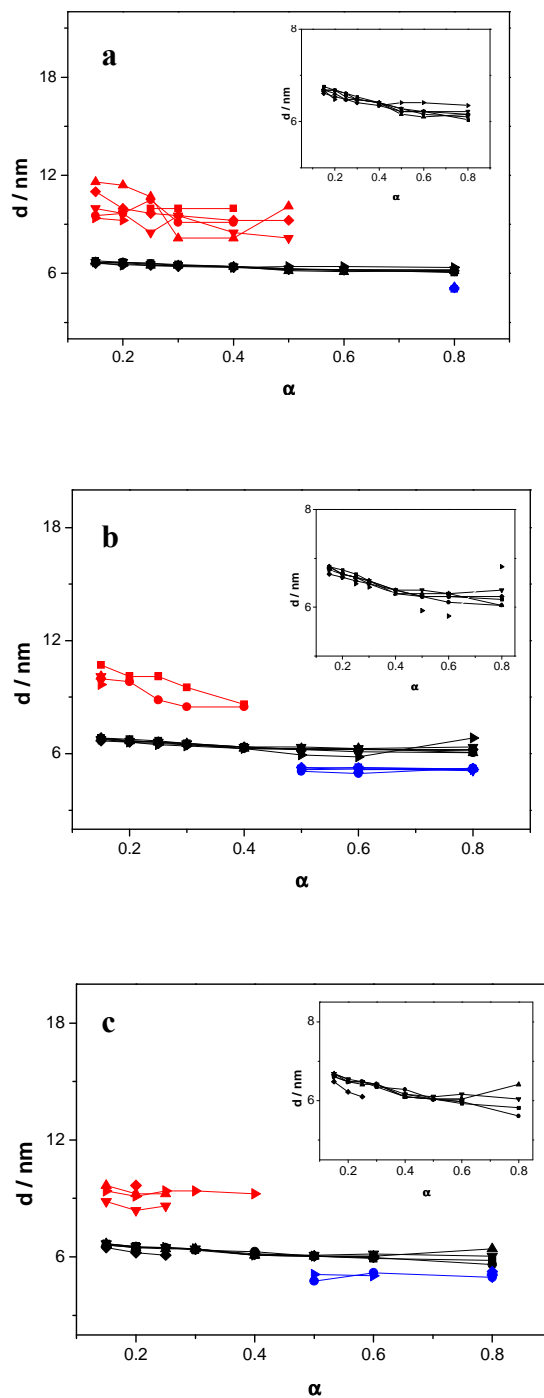
| $C_{16}C_5C_{16}$ /DOPE-pDNA |            |           |      |           |      |           |      |           |      |           |      |      |         |      |         |      |         |
|------------------------------|------------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|------|---------|------|---------|------|---------|
|                              |            | $\alpha$  |      |           |      |           |      |           |      |           |      |      |         |      |         |      |         |
|                              |            | 0.15      |      | 0.20      |      | 0.25      |      | 0.30      |      | 0.40      |      | 0.50 |         | 0.60 |         | 0.80 |         |
| $\rho_{\text{eff}}$          |            | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | Main | CL rich | Main | CL rich | Main | CL rich |
| 2.3                          | $q_{100}$  | 0.59      | 0.92 | 0.62      | 0.93 | 0.62      | 0.94 | 0.66      | 0.96 | 0.73      | 0.99 | 1.01 | 1.19    | 1.01 | 1.20    | 1.02 | 1.21    |
|                              | $d_{100}$  | 10.7      | 6.83 | 10.1      | 6.76 | 10.1      | 6.68 | 9.52      | 6.54 | 8.61      | 6.35 | 6.22 | 5.28    | 6.22 | 5.24    | 6.16 | 5.19    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.29 |           | 1.30 |           | 1.32 |           | 1.49 |           | 1.53 | 1.57 |         | 1.79 |         | 1.83 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.87 |           | 4.83 |           | 4.76 |           | 4.22 |           | 4.11 | 4.00 |         | 3.51 |         | 3.43 |         |
| 4.7                          | $q_{100}$  | 0.63      | 0.92 | 0.64      | 0.94 | 0.71      | 0.95 | 0.74      | 0.97 | 0.74      | 1.00 | 1.01 | 1.21    | 1.03 | 1.19    | 1.04 | 1.21    |
|                              | $d_{100}$  | 9.97      | 6.83 | 9.82      | 6.68 | 8.85      | 6.61 | 8.49      | 6.48 | 8.49      | 6.28 | 6.22 | 5.19    | 6.10 | 5.28    | 6.04 | 5.19    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.32 |           | 1.36 |           | 1.37 |           | 1.45 |           | 1.52 | 1.57 |         | 1.74 |         | 1.75 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.76 |           | 4.62 |           | 4.59 |           | 4.33 |           | 4.13 | 4.00 |         | 3.61 |         | 3.59 |         |
| 7.0                          | $q_{100}$  | 0.62      | 0.92 |           | 0.94 |           | 0.95 |           | 0.96 |           | 1.00 | 1.00 | 1.24    | 1.00 | 1.27    | 1.04 | 1.20    |
|                              | $d_{100}$  | 10.1      | 6.83 |           | 6.68 |           | 6.61 |           | 6.54 |           | 6.28 | 6.28 | 5.07    | 6.28 | 4.95    | 6.04 | 5.24    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.33 |           | 1.29 |           | 1.33 |           | 1.37 |           | 1.56 | 1.54 |         | 1.60 |         | 1.77 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.72 |           | 4.87 |           | 4.72 |           | 4.59 |           | 4.03 | 4.08 |         | 3.93 |         | 3.55 |         |
| 9.3                          | $q_{100}$  | 0.62      | 0.93 |           | 0.94 |           | 0.95 |           | 0.96 |           | 0.99 | 0.99 |         | 1.00 | 1.22    | 0.99 | 1.21    |
|                              | $d_{100}$  | 10.1      | 6.76 |           | 6.68 |           | 6.61 |           | 6.54 |           | 6.35 | 6.35 |         | 6.28 | 5.15    | 6.35 | 5.19    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.31 |           | 1.37 |           | 1.36 |           | 1.37 |           | 1.49 | 1.56 |         | 1.59 |         | 1.69 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.80 |           | 4.59 |           | 4.62 |           | 4.59 |           | 4.22 | 4.03 |         | 3.95 |         | 3.72 |         |
| 11.6                         | $q_{100}$  | 0.65      | 0.93 |           | 0.95 |           | 0.97 |           | 0.98 |           | 1.00 | 1.06 |         | 1.08 | 1.21    | 0.92 | 1.23    |
|                              | $d_{100}$  | 9.67      | 6.76 |           | 6.61 |           | 6.48 |           | 6.41 |           | 6.28 | 5.93 |         | 5.82 | 5.19    | 6.83 | 5.11    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.45 |           | 1.39 |           | 1.42 |           | 1.59 |           | 1.61 | 1.67 |         | 1.51 |         | 1.78 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.33 |           | 4.52 |           | 4.42 |           | 3.95 |           | 3.90 | 3.76 |         | 4.16 |         | 3.53 |         |
| 14.0                         | $q_{100}$  |           | 0.94 |           | 0.95 |           | 0.96 |           | 0.97 |           | 0.99 | 1.01 | 1.22    | 1.01 | 1.21    | 1.01 | 1.22    |
|                              | $d_{100}$  |           | 6.68 |           | 0.61 |           | 6.54 |           | 6.48 |           | 6.35 | 6.22 | 5.15    | 6.22 | 5.19    | 6.22 | 5.15    |
|                              | $q_{pDNA}$ |           | 1.30 |           | 1.30 |           | 1.33 |           | 1.34 |           | 1.45 | 1.48 |         | 1.60 |         | 1.79 |         |
|                              | $d_{pDNA}$ |           | 4.83 |           | 4.83 |           | 4.72 |           | 4.69 |           | 4.33 | 4.25 |         | 3.93 |         | 3.51 |         |

$d$  values in nm;  $q$  values in nm<sup>-1</sup>

**Table S-4. Values of  $q_{100}$ ,  $d_{100}$ ,  $q_{pDNA}$  and  $d_{pDNA}$  of the  $L_{\alpha}$  lamellar structures found for  $C_{16}C_{12}C_{16}$ /DOPE-pDNA at several CL compositions,  $\alpha$ , of the mixed lipid and at several effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$**

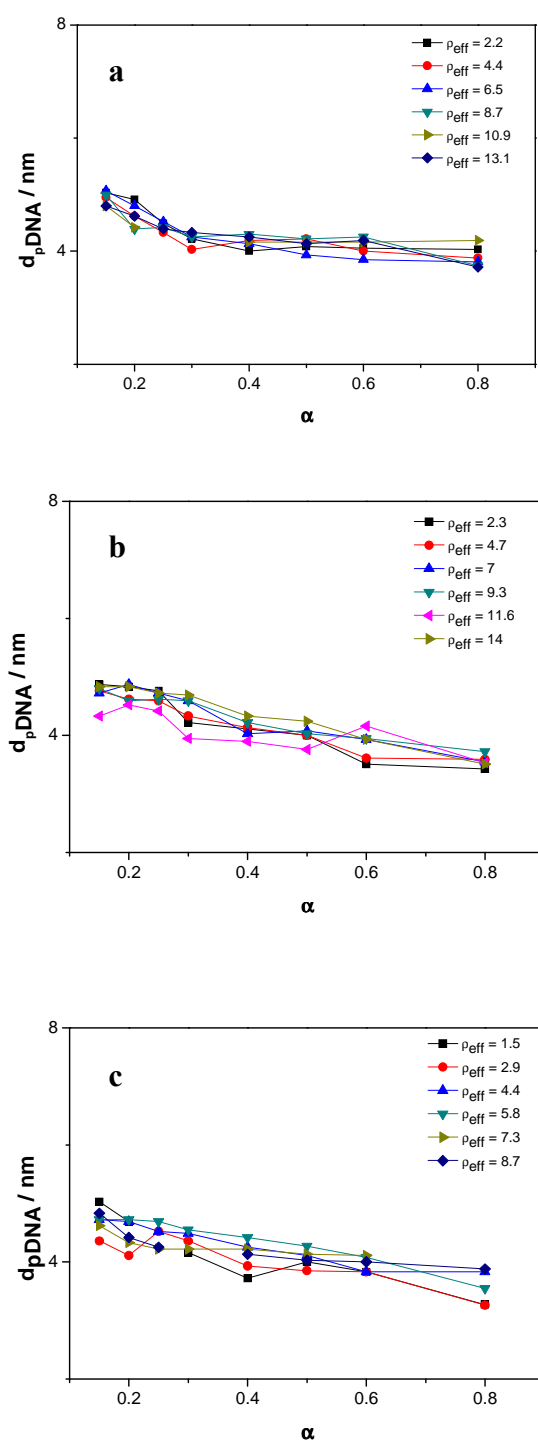
| $C_{16}C_{12}C_{16}$ /DOPE-pDNA |            |           |      |           |      |           |      |           |      |           |      |           |      |         |      |         |      |         |
|---------------------------------|------------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|---------|------|---------|------|---------|
|                                 |            | $\alpha$  |      |           |      |           |      |           |      |           |      |           |      |         |      |         |      |         |
|                                 |            | 0.15      |      | 0.20      |      | 0.25      |      | 0.30      |      | 0.40      |      | 0.50      |      |         | 0.60 |         | 0.80 |         |
| $\rho_{\text{eff}}$             |            | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | DOPE rich | Main | CL rich | Main | CL rich | Main | CL rich |
| 1.5                             | $q_{100}$  |           | 0.94 |           | 0.96 |           | -    |           | 0.99 |           | 1.03 |           | 1.04 |         | 1.06 |         | 1.08 |         |
|                                 | $d_{100}$  |           | 6.68 |           | 6.54 |           | -    |           | 6.35 |           | 6.10 |           | 6.04 |         | 5.93 |         | 5.82 |         |
|                                 | $q_{pDNA}$ |           | 1.25 |           | 1.34 |           | -    |           | 1.51 |           | 1.69 |           | 1.57 |         | 1.64 |         | 1.92 |         |
|                                 | $d_{pDNA}$ |           | 5.03 |           | 4.69 |           | -    |           | 4.16 |           | 3.72 |           | 4.00 |         | 3.83 |         | 3.27 |         |
| 2.9                             | $q_{100}$  |           | 0.95 |           | 0.97 |           | 0.97 |           | 0.99 |           | 1.00 |           | 1.04 | 1.32    | 1.05 | 1.21    | 1.12 | 1.27    |
|                                 | $d_{100}$  |           | 6.61 |           | 6.48 |           | 6.48 |           | 6.35 |           | 6.28 |           | 6.04 | 4.76    | 5.98 | 5.19    | 5.61 | 4.95    |
|                                 | $q_{pDNA}$ |           | 1.44 |           | 1.53 |           | 1.39 |           | 1.44 |           | 1.6  |           | 1.63 |         | 1.64 |         | 1.93 |         |
|                                 | $d_{pDNA}$ |           | 4.36 |           | 4.11 |           | 4.52 |           | 4.36 |           | 3.93 |           | 3.85 |         | 3.83 |         | 3.26 |         |
| 4.4                             | $q_{100}$  | 0.65      | 0.94 | 0.68      | 0.97 | 0.68      | 0.98 |           | 0.98 |           | 1.03 |           | 1.04 |         | 1.04 |         | 0.98 | 1.21    |
|                                 | $d_{100}$  | 9.67      | 6.68 | 9.24      | 6.48 | 9.24      | 6.41 |           | 6.41 |           | 6.10 |           | 6.04 |         | 6.04 |         | 6.41 | 5.19    |
|                                 | $q_{pDNA}$ |           | 1.33 |           | 1.34 |           | 1.39 |           | 1.40 |           | 1.48 |           | 1.53 |         | 1.64 |         | 1.64 |         |
|                                 | $d_{pDNA}$ |           | 4.72 |           | 4.69 |           | 4.52 |           | 4.49 |           | 4.25 |           | 4.11 |         | 3.83 |         | 3.83 |         |
| 5.8                             | $q_{100}$  | 0.71      | 0.94 | 0.75      | 0.96 | 0.73      | 0.97 |           | 0.98 |           | 1.02 |           | 1.03 |         | 1.02 |         | 1.04 | 1.26    |
|                                 | $d_{100}$  | 8.85      | 6.68 | 8.38      | 6.54 | 8.61      | 6.48 |           | 6.41 |           | 6.16 |           | 6.10 |         | 6.16 |         | 6.04 | 4.99    |
|                                 | $q_{pDNA}$ |           | 1.33 |           | 1.33 |           | 1.34 |           | 1.38 |           | 1.42 |           | 1.47 |         | 1.54 |         | 1.77 |         |
|                                 | $d_{pDNA}$ |           | 4.72 |           | 4.72 |           | 4.69 |           | 4.55 |           | 4.42 |           | 4.27 |         | 4.08 |         | 3.55 |         |
| 7.3                             | $q_{100}$  | 0.67      | 0.95 | 0.69      | 0.97 | 0.67      | 0.97 | 0.67      | 0.98 | 0.68      | 1.03 | 0.69      | 1.04 | 1.23    | 1.04 | 1.25    | -    |         |
|                                 | $d_{100}$  | 9.38      | 6.61 | 9.11      | 6.48 | 9.38      | 6.48 | 9.38      | 6.41 | 9.24      | 6.10 | 9.11      | 6.04 | 5.11    | 6.04 | 5.03    | -    |         |
|                                 | $q_{pDNA}$ |           | 1.36 |           | 1.45 |           | 1.49 |           | 1.49 |           | 1.49 |           | 1.52 |         | 1.53 |         | -    |         |
|                                 | $d_{pDNA}$ |           | 4.62 |           | 4.33 |           | 4.22 |           | 4.22 |           | 4.22 |           | 4.13 |         | 4.11 |         | -    |         |
| 8.7                             | $q_{100}$  |           | 0.97 | 0.65      | 1.01 |           | 1.03 |           | -    |           | 1.02 |           | 1.04 |         | 1.05 |         | 1.03 | 1.20    |
|                                 | $d_{100}$  |           | 6.48 | 9.67      | 6.22 |           | 6.10 |           | -    |           | 6.16 |           | 6.04 |         | 5.98 |         | 6.10 | 5.24    |
|                                 | $q_{pDNA}$ |           | 1.30 |           | 1.42 |           | 1.48 |           | -    |           | 1.52 |           | 1.56 |         | 1.57 |         | 1.62 |         |
|                                 | $d_{pDNA}$ |           | 4.83 |           | 4.42 |           | 4.25 |           | -    |           | 4.13 |           | 4.03 |         | 4.00 |         | 3.88 |         |

$d$  values in nm;  $q$  values in  $\text{nm}^{-1}$

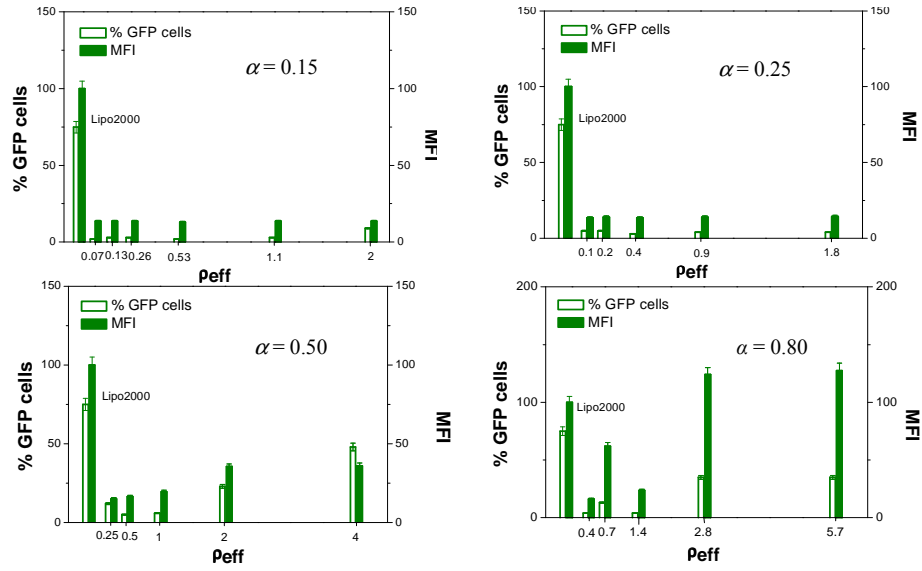


**Figure S-5.** Plots of the periodic distance of the lamellar structure,  $d$ , as a function of CL composition,  $\alpha$ , and at several effective charge ratios,  $\rho_{eff}$ , for  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes: (a)  $n = 3$ ; (b)  $n = 5$ ; and (c)  $n = 12$ . Red symbols,  $L_{\alpha, DOPE\ rich}$  structure; black symbols,  $L_{\alpha, main}$  structure; and blue symbols,  $L_{\alpha, CL\ rich}$  structure.

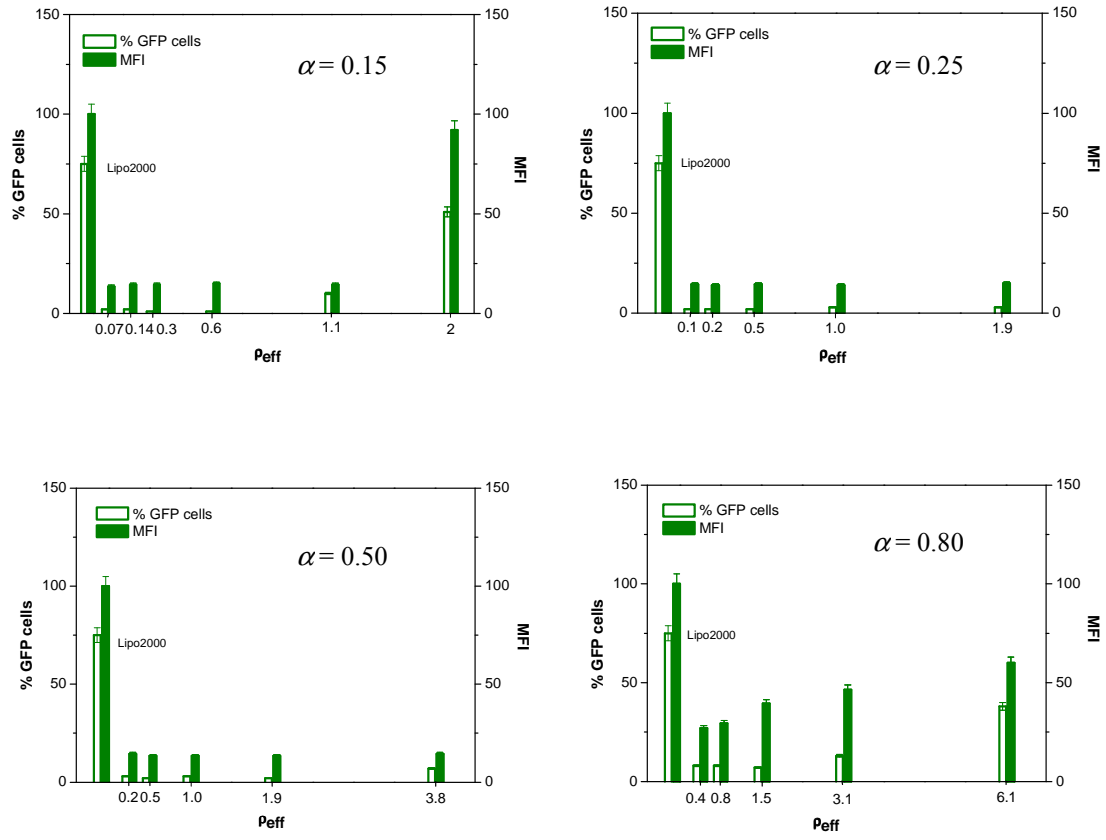




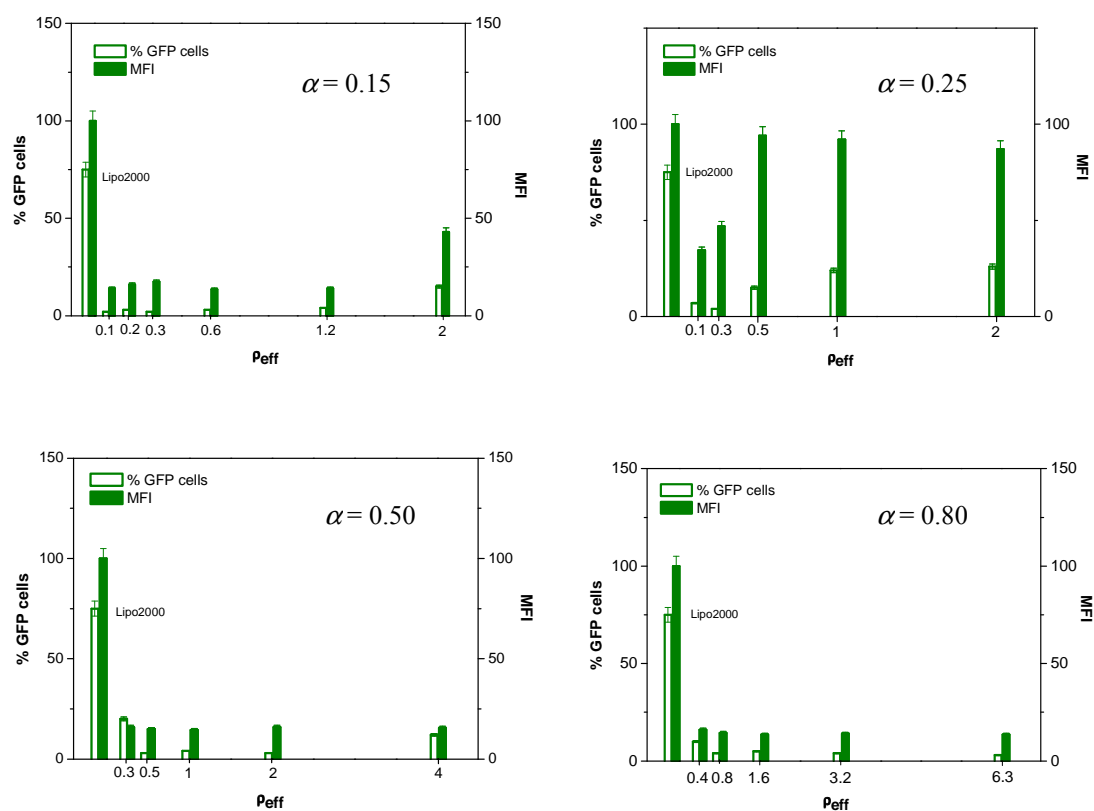
**Figure S-6.** Plots of the distance  $d_{pDNA}$  as a function of CL composition,  $\alpha$ , at several effective charge ratios,  $\rho_{eff}$ , for  $C_{16}C_nC_{16}$ /DOPE-pDNA lipoplexes: (a)  $n = 3$ ; (b)  $n = 5$ ; and (c)  $n = 12$ .



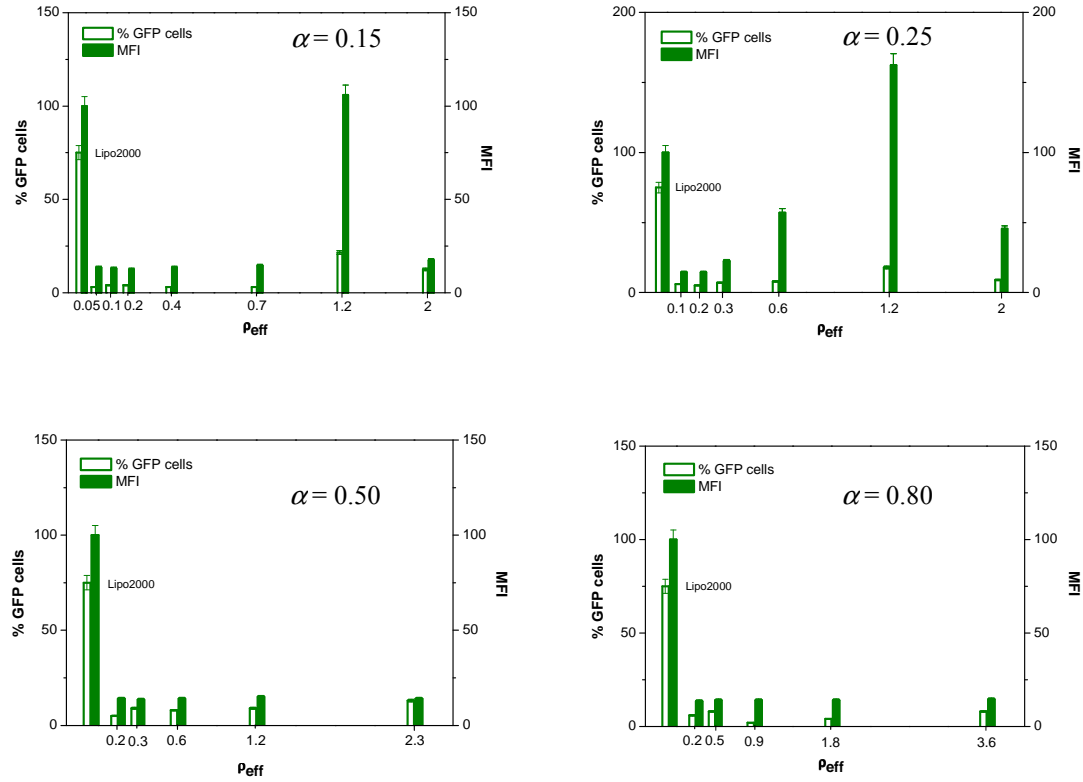
**Figure S-7.** Transfection efficiency (% GFP cells and MFI) of pEGFP-C3 plasmid DNA using C<sub>16</sub>C<sub>2</sub>C<sub>16</sub>/DOPE-pDNA in HEK293T cells against  $\rho_{\text{eff}}$  at several CL compositions,  $\alpha$  in absence of serum condition (-FBS-FBS). Also shown is the transfection by Lipofectamine2000, as a control.



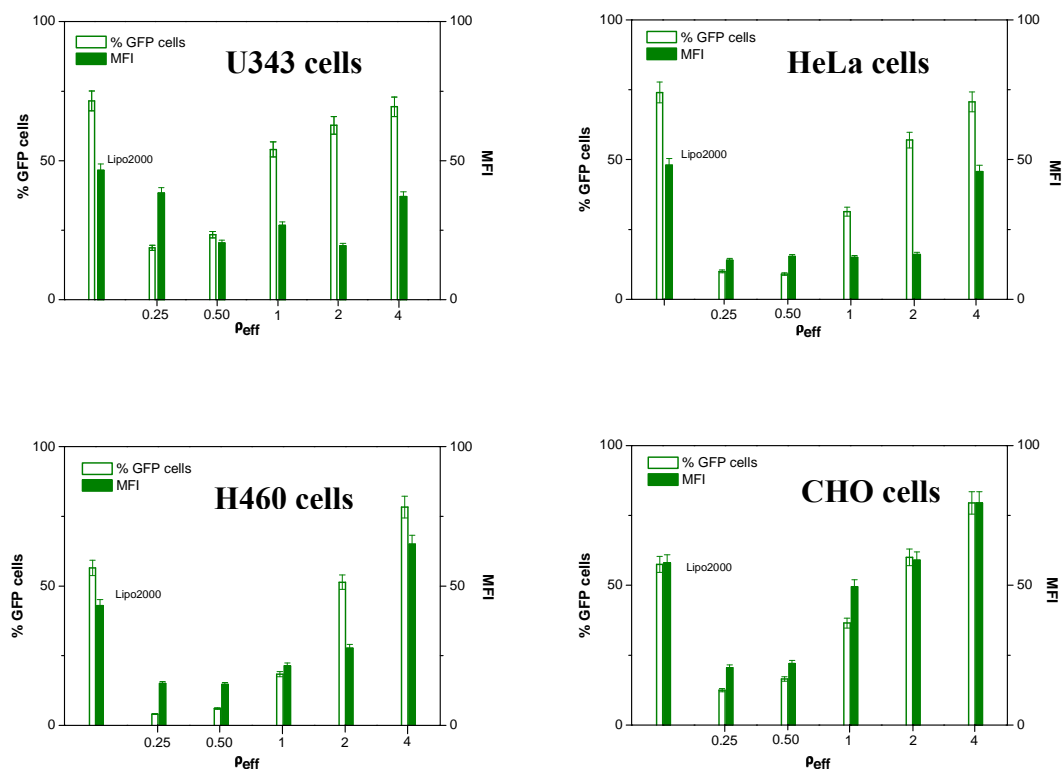
**Figure S-8.** Transfection efficiency (% GFP cells and MFI) of pEGFP-C3 plasmid DNA using  $C_{16}C_3C_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes in HEK293T cells against  $\rho_{eff}$ , at several CL compositions,  $\alpha$ , in absence of serum (-FBS-FBS). Also included are the results for Lipofectamine2000–pEGFP-C3 plasmid DNA complexes, as a control.



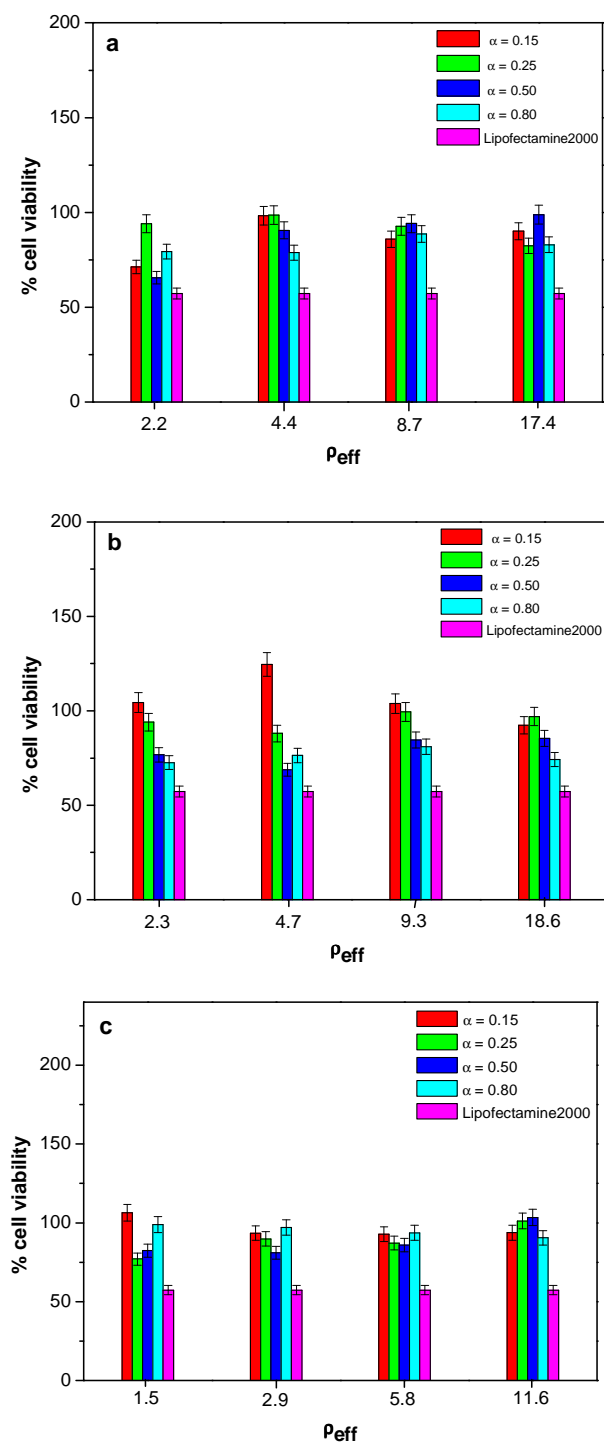
**Figure S-9.** Transfection efficiency (% GFP cells and MFI) of pEGFP-C3 plasmid DNA using C<sub>16</sub>C<sub>5</sub>C<sub>16</sub>/DOPE-pDNA lipoplexes in HEK293T cells against  $\rho_{\text{eff}}$ , at several CL compositions,  $\alpha$ , in absence of serum (-FBS-FBS). Also included are the results for Lipofectamine2000–pEGFP-C3 plasmid DNA complexes, as a control.



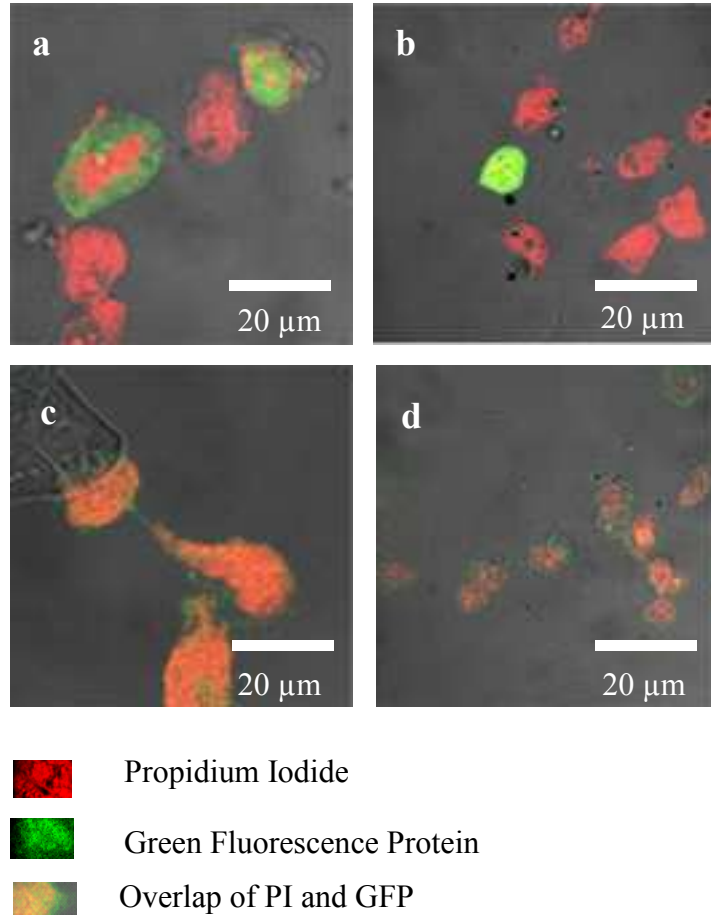
**Figure S-10.** Transfection efficiency (% GFP cells and MFI) of pEGFP-C3 plasmid DNA using  $C_{16}C_{12}C_{16}/DOPE$ -pDNA lipoplexes in HEK293T cells against  $\rho_{eff}$ , at several CL compositions,  $\alpha$ , in absence of serum (-FBS-FBS). Also included are the results for Lipofectamine2000–pEGFP-C3 plasmid DNA complexes, as a control.



**Figure S-11.** Transfection efficiency (% GFP cells and MFI) of  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pEGFP-C3 plasmid DNA lipoplexes at CL composition  $\alpha = 0.5$  for four cell lines. Also included are the results for Lipofectamine2000-pEGFP-C3 plasmid DNA complexes, as a control. Experiments were performed in presence of 10% serum (-FBS+FBS).



**Figure S-12.** Cytotoxicity assay (MTT) as a function of  $\rho_{eff}$ , at several CL compositions,  $\alpha$ , for  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA: (a)  $n = 3$ ; (b)  $n = 5$ ; and (c)  $n = 12$ . Also shown is the cytotoxicity by Lipofectamine2000, as a control.



**Figure S-13.** Confocal Fluorescence Microscopy of  $C_{16}C_nC_{16}/DOPE$ -pDNA ( $n = 2, 3, 5$  and 12) transfected HEK293T cells, at  $\alpha = 0.5$  and  $\rho_{\text{eff}} = 2$ , in absence of serum (-FBS-FBS). Images show the GFP expression in cells after being transfected with (a)  $C_{16}C_2C_{16}/DOPE$ -pDNA; (b)  $C_{16}C_3C_{16}/DOPE$ -pDNA; (c)  $C_{16}C_5C_{16}/DOPE$ -pDNA and (d)  $C_{16}C_{12}C_{16}/DOPE$ -pDNA.



### 3.2.2. DISCUSIÓN

El objeto del estudio de este apartado ha sido determinar las propiedades y eficiencia como vectores coloidales del plásmido DNA, de los lipoplejos formados con lípidos monovalentes comerciales, (DC-Chol/DOPE-pDNA, DOEPC/DOPE-pDNA), y los formados con lípidos gemini,  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-pDNA$ , con  $n = 2, 3, 5$  ó  $12$ . Los lípidos gemini de dos cabezas catiónicas han sido sintetizados especialmente para este estudio, y los lipoplejos que forman con el pDNA, caracterizados desde ambos puntos de vista, biofísico y bioquímico, constituyen el soporte fundamental de este apartado. Como ya se mencionó en la presentación de los citados artículos, es necesario resaltar que los dos tipos de estudios, biofísico y bioquímico, se han realizado de modo complementario y coordinado por primera vez, y en las mismas condiciones. Para ello, en todos los experimentos llevados a cabo en este apartado se ha utilizado el plásmido pEGFP-C3 DNA (pDNA), que a pH fisiológico se encuentra en forma circular superenrollada, en lugar de utilizar fragmentos de DNA lineal de doble hebra procedente del timo de ternero (ctDNA) o de esperma de salmón para los experimentos biofísicos y el pDNA circular superenrollado para los experimentos bioquímicos, como se venía haciendo erróneamente en la bibliografía hasta la fecha.

La **interacción entre el liposoma mixto y el pDNA** es importante en el proceso de formación de los lipoplejos. Por ello y para analizar este aspecto, se ha realizado un *estudio electroquímico* con la ayuda de la *movilidad electroforética*,  $\mu_e$ , y del *potencial zeta*,  $\zeta$ , puesto que estas propiedades electroquímicas son las que mejor reflejan el balance de cargas producido entre el liposoma mixto y el pDNA al formarse el lipoplejo. Como se ha explicado anteriormente, muchas de las propiedades de los lipoplejos cambian en el punto de electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , donde  $\rho_{eff} = 1$ , por encima del cuál el lipoplejo está cargado positivamente. Esta carga positiva es un requisito indispensable para que pueda producirse la interacción atractiva entre el lipoplejo y las membranas celulares cargadas negativamente. El conjunto de resultados de la bibliografía publicados por distintos grupos de investigación en este campo han confirmado que el DNA lineal, como el del timo de ternera (ctDNA) o el del esperma de salmón, ofrecen toda su carga negativa accesible al lípido catiónico, y por tanto,  $q_{linealDNA}^- = -2$ . Sin embargo, experimentos recientes de nuestro grupo<sup>5-7</sup> han demostrado que a pH fisiológico y dependiendo de la fuerza iónica, el plásmido DNA (pDNA) permanece en una conformación superenrollada, de modo que rinde una carga negativa menor que su carga nominal, es decir,  $q_{pDNA}^- \ll -2$ . Por este

motivo, cualquier estudio biofísico o bioquímico de lipoplejos debe empezar por la determinación de las cargas reales o efectivas de ambos compuestos, el lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , y el plásmido DNA,  $q_{pDNA}^-$ , cuando forman el lipoplejo, habida cuenta de que el lípido zwitteriónico, DOPE, presenta carga neta nula a pH fisiológico. Estas propiedades están relacionadas entre sí y con el valor de  $(L/D)$  en el punto de electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ , mediante las siguientes ecuaciones:

$$\alpha = \frac{L^+ / M_{L^+}}{(L^+ / M_{L^+}) + (L^0 / M_{L^0})} \quad (3.1)$$

$$\rho_{eff} = \frac{n^+}{n^-} = \frac{q_{L^+}^+ L^+ / M_{L^+}}{q_{DNA}^- D / M_{bp}} \quad (3.2)$$

$$\left(\frac{L}{D}\right)_\phi = \frac{q_{DNA}^- [\alpha M_{L^+} + (1-\alpha) M_{L^0}]}{q_{L^+}^+ \alpha M_{bp}} \quad (3.3)$$

en las que el resto de las magnitudes implicadas ya fueron definidas en el apartado 1.3.2.

Por tanto, en un primer paso se ha determinado la carga efectiva del lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , para un cierto valor de la fracción molar,  $\alpha$ , a partir de la ecuación (3.3), y haciendo uso del valor de  $(L/D)_\phi$  determinado experimentalmente con el potencial zeta para los lipoplejos CL/DOPE-ctDNA (en el que  $q_{ctDNA}^- = -2$ ). Las Figuras 1 y S-1 a S-6 del Art. 3 muestran los valores de  $\zeta$  vs  $L/D$  a distintos valores de  $\alpha$  para los lipoplejos DC-Chol/DOPE-ctDNA, DOEPC/DOPE-ctDNA y  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n$ /DOPE-ctDNA, es decir, los lipoplejos formados con DNA lineal (y en los que la carga del ctDNA  $q_{ctDNA}^- = -2$  por par de bases). El valor de  $q_{L^+}^+$  obtenido, independiente del valor de la fracción molar,  $\alpha$ , para cada uno de los lípidos catiónicos analizados ha sido  $(1,00 \pm 0,05)$  para los lípidos monovalentes, DC-Chol y DOEPC, y  $(2,00 \pm 0,05)$  para los lípidos gemini de la serie  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n$  (Art. 4), con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , independientemente de la longitud,  $n$ , de la cadena alquílica espaciadora y del valor de  $\alpha$ . Estos resultados confirman que las cabezas polares de todos los lípidos catiónicos utilizados para preparar los lipoplejos de este apartado poseen una carga efectiva que coincide con su carga nominal (+1 para los lípidos monovalentes y +2 para los divalentes). No obstante, este comportamiento no es general, ya que los lipoplejos de la serie  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n$ /DOPE-pDNA, con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , constituidos por lípidos catiónicos gemini con cabezas polares tipo imidazol,

estudiados recientemente por el grupo, muestran valores de  $q_{L^+}^+$  menores que su valor nominal.<sup>8</sup>

Una vez obtenida la carga efectiva del lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , el segundo paso ha sido la determinación de la carga efectiva del plásmido por par de bases,  $q_{pDNA}^-$ , a partir del mismo tipo de medidas de potencial zeta, determinando  $(L/D)_\phi$  del lipoplejo en las mismas condiciones experimentales, pero ahora utilizando el plásmido circular DNA superenrollado, en vez del lineal ctDNA, (Figuras 1 y S-1-6 del Art. 3 y Figuras 1 y S-1 del Art. 4), y haciendo uso de la ecuación:

$$q_{pDNA}^- = \left( \frac{L}{D} \right)_\phi \left( \frac{q_{L^+}^+ \alpha \bar{M}_{bp}}{\alpha M_{L^+} + (1-\alpha) M_{L^0}} \right) \quad (3.4)$$

Como puede observarse en las Figuras 1 y S-1-6 del Art. 3 y las Figuras 1 y S-1 del Art. 4, el valor experimental de  $(L/D)_\phi$ , es menor en presencia de pDNA que con el ctDNA para un mismo liposoma mixto, lo que significa que para alcanzar la electroneutralidad del lipoplejo (y por tanto para formar el lipoplejo con carga positiva) es necesaria una menor cantidad de liposoma mixto catiónico (Tabla 1 de los Arts. 3 y 4). En la Figura S-1 del Art. 4 también se observa que el valor de  $(L/D)_\phi$  disminuye a medida que aumenta la cantidad de lípido catiónico en el liposoma mixto, comportamiento esperado ya que en el valor de  $L$  ( $= L^+ + L^0$ ) está incluida la masa del lípido zwitteriónico. Los valores de  $q_{pDNA}^-$ , obtenidos a varias fracciones molares del lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , para los lipoplejos DC-Chol/DOPE-pDNA, DOEPC/DOPE-pDNA y los cuatro sistemas de la familia  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-pDNA$  son aproximadamente similares ( $-0,45 \pm 0,15$ ) para un valor dado de  $\alpha$ , e independientes de la longitud,  $n$ , del espaciador entre las dos cabezas polares del lípido catiónico (Figura 2 del Art. 3 y Figura 3 del Art. 4). Este aspecto es extraordinariamente importante en los estudios de transfección celular, puesto que, al ser bastante menor la carga efectiva del pDNA circular superenrollado que la del ctDNA lineal, en el primer caso se requiere una cantidad de lípido catiónico mucho menor (solo el 25%) de la esperada si su carga fuese la nominal, (-2), para formar lipoplejos catiónicos. Ello proporciona otro aspecto adicional favorable para la transfección puesto que conlleva una considerable reducción de la citotoxicidad provocada en su administración a las células. Además, los lipoplejos constituidos por lípidos catiónicos gemini de dos cabezas polares, requieren una menor cantidad de lípido catiónico que los lipoplejos formados por lípidos catiónicos de una cabeza polar, como son el DOEPC y el DC-Chol (Arts. 1 y 2) lo

que refuerza su potencial uso como vectores liposomales del pDNA frente a los lípidos catiónicos monovalentes comerciales.

El hábito sigmoidal del potencial zeta vs  $(L/D)$  y la inversión de carga en la electroneutralidad también ha revelado que la interacción liposoma mixto catiónico-pDNA es debida a interacciones superficiales y electrostáticas (atracciones coulombicas) producidas entre nanoagregados cargados. Pero en el proceso de formación del lipoplejo el efecto de orden juega también un papel tan importante como el electrostático y por tanto debe ser tenido en cuenta. Así, cuando se forma el lipoplejo estable, parte de los contraiones  $\text{Br}^-$  del liposoma mixto, y  $\text{Na}^+$  del pDNA, son liberados al medio acuoso tamponado dando lugar a un considerable aumento de la entropía.

Los experimentos de electroforesis en gel de agarosa han confirmado los valores de  $(L/D)_\phi$  y el tipo de interacción entre el liposoma mixto-pDNA para la serie de lipoplejos  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_n/\text{DOPE-pDNA}$  (Figuras S-11 y 2 de los Art. 3 y 4, respectivamente). En dichas figuras se puede observar que, independientemente de la fracción molar de lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , por encima de una determinada relación de cargas efectivas,  $\rho_{\text{eff}}$ , a partir de la cuál se puede estimar  $(L/D)_\phi$ , el lípido catiónico mixto protege totalmente el pDNA, el cuál permanece retenido en el pocillo, de modo que no se observa fluorescencia en el carril. Por otro lado, también se ha utilizado un tercer método, la espectroscopia de fluorescencia con intercalación de la sonda fluorescente GelRed, para determinar  $(L/D)_\phi$ , aunque solo para el lipoplejo  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_2/\text{DOPE-pDNA}$  (Figuras S-7 y S-8 del Art. 3). El GelRed es una sonda fluorescente que se intercala entre los pares de bases del pDNA de modo similar a la sonda EtBr, pero con la ventaja de no ser cancerígena. El GelRed, apenas fluoresce en el medio acuoso pero cuando se encuentra intercalado entre los pares de bases del pDNA presenta una elevada intensidad de emisión, la cuál va disminuyendo a medida que la sonda es desplazada hacia el medio cuando el liposoma mixto interacciona con el DNA para formar el lipoplejo. El tratamiento de los espectros de emisión llevado a cabo es totalmente análogo al desarrollado previamente con el EtBr, que ha sido explicado con detalle en el apartado 3.1. Los valores experimentales de  $(L/D)_\phi$  obtenidos con este método que se presentan en la Tabla 1 del Art. 3 están en total concordancia con los obtenidos con potencial zeta, tanto para los lipoplejos con lípidos catiónicos monovalentes DOEPC/DOPE-ctDNA y DC-Chol/DOPE-ctDNA,<sup>9,10</sup> como para lipoplejos con lípidos catiónicos divalentes como el  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_2/\text{DOPE-pDNA}$ . En cualquier caso, los valores de  $(L/D)_\phi$  obtenidos con potencial zeta y con fluorescencia GelRed para los

lipoplejos con pDNA son menores que los estimados a partir de la ecuación (3) (Art. 3), lo que confirma que parte de las contraiones  $\text{Na}^+$  del pDNA permanecen asociados al pDNA cuando se ha formado el lipoplejo, siendo la carga negativa efectiva del pDNA menor que la que presenta el ctDNA,  $q_{\text{ctDNA}}^- = -2$ , en el cuál al estar todas sus cargas disponibles coincide con su valor nominal. La concordancia en los valores de  $(L/D)_\phi$  obtenidos con los 3 métodos utilizados ha sido excelente.

**La estructura, tamaño y morfología de estos lipoplejos**, importante en la eficiencia en transfección del pDNA, han sido estudiados por medio de dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) y de crio-microscopía electrónica de transmisión (crio-TEM). Con el equipo ZetaPALS también se ha determinado el diámetro hidrodinámico de los liposomas mixtos siendo los valores obtenidos ( $102 \pm 15$ ,  $109 \pm 10$ ,  $100 \pm 8$  y  $97 \pm 8$ ) nm para la serie  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_n/\text{DOPE}$ , con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , valores consistentes con el diámetro del filtro del extrusor (100 nm) utilizado en el protocolo secuencial descrito en el apartado 2.2.2 para disminuir el tamaño y la polidispersidad de los liposomas mixtos inicialmente preparados.

La estructura de los lipoplejos  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_n/\text{DOPE-pDNA}$ , con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , se ha determinado mediante dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS). Este estudio se ha realizado cubriendo un amplio intervalo de fracciones molares del lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y de relaciones de carga efectiva,  $\rho_{\text{eff}}$ , entre el lípido catiónico y el plásmido DNA (pDNA). A diferencia de los lipoplejos DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA,<sup>9,10</sup> del apartado anterior, los lipoplejos de la serie  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_n/\text{DOPE-pDNA}$  presentan varias estructuras lamelares coexistentes (Art. 4).

Todos los difractogramas (intensidad vs vector de ondas,  $q$ ) de los lipoplejos  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_n/\text{DOPE-pDNA}$ , con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , muestran 3 picos que se ajustan a una estructura lamelar,  $L_\alpha$ , que se ha denominado principal,  $L_{\alpha,\text{main}}$ , con un espaciado interlamelar,  $d$ , que está relacionado con el vector  $q$  del primer pico mediante  $q = 2\pi/q_{100}$  (Art. 4). Esta estructura está formada por capas alternas de bicapas lipídicas mixtas con el pDNA intercalado en la región acuosa entre cada dos bicapas en una disposición tipo “sandwich” (Esquema 2 del Art. 4), en la que el espaciado  $d (= d_m + d_w)$  se corresponde con la suma de los espesores de la bicapa lipídica,  $d_m$ , y de la monocapa acuosa de pDNA,  $d_w$ . El pico ancho no asignado a esta estructura informa de la correlación pDNA-pDNA, es decir, la separación existente entre las dobles hélices de pDNA en la monocapa,  $d_{\text{pDNA}} (=$

$2\pi/q_{pDNA}$ ) (Tablas S-1 a S-4 del Art. 4). Además de los mencionados picos, en la mayoría de los difractogramas también aparecen otros picos (Figura 5 del Art. 4), que indexan correctamente con otras 2 estructuras lamelares, una en rojo ( $L_{\alpha,DOPErich}$ ) que se presenta en la región rica en lípido coadyuvante DOPE ( $\alpha \leq 0,5$ ), y otra en azul ( $L_{\alpha,CLrich}$ ) que aparece en la región rica en lípido catiónico ( $\alpha \geq 0,5$ ). En varias fracciones molares, entre  $0,4 \leq \alpha \leq 0,6$ , y a varias relaciones de cargas efectiva,  $\rho_{eff}$ , los difractogramas muestran, incluso, la coexistencia de las tres estructuras (Figura 5c y Tablas S-1 del Art. 4). Es la primera vez en la bibliografía que se han encontrado tres estructuras coexistentes en el mismo lipoplejo, si bien en las Tablas S-1 a S-4 del Art. 4 se observa que el nº de estructuras coexistentes disminuye a medida que aumenta  $\alpha$ ,  $\rho_{eff}$ , o la longitud del espaciador,  $n$ , de los CL gemini (para  $n = 2$  o  $3$ , aparecen mayor número de difractogramas con dos estructuras coexistentes que para  $n = 5$  o  $12$ ). Los valores medios de espaciado,  $d$ , obtenidos para los distintos valores de  $\alpha$ , y  $\rho_{eff}$ , para cada una de las estructuras lamelares, han sido representados en función de  $\alpha$  (Figuras 6 y S-5 del Art. 4). Se observa que los valores de  $d$  para cada una de las estructuras son aproximadamente independientes de  $\alpha$  y siguen el orden ( $d_{L_{\alpha,CLrich}} \sim 5 \text{ nm}$ )  $<$  ( $d_{L_{\alpha,main}} \sim 6-7 \text{ nm}$ )  $<$  ( $d_{L_{\alpha,DOPErich}} \sim 9-11 \text{ nm}$ ). Este comportamiento ha sido atribuido a varios aspectos: i) a que cuando  $\alpha$  aumenta, disminuye el espesor de la bicapa lipídica,  $d_m$ , debido a que la longitud de las cadenas hidrofóbicas de los lípidos gemini de esta serie (16 C) es menor que la de las cadenas hidrofóbicas del DOPE (18 C) y, ii) a una mayor compactación del pDNA que hace que disminuya  $d_w$  al aumentar  $\alpha$ . Por otro lado, el pico ancho de la correlación pDNA-pDNA, asignado a las estructuras lamelares,  $L_{\alpha,main}$  y  $L_{\alpha,CLrich}$ , ha permitido obtener la separación entre las dobles hélices de pDNA<sup>11</sup> en la monocapa,  $d_{pDNA}$ . Estos valores, representados vs  $\alpha$  en las Figuras 7 y S-6 del Art. 4, descienden (de 5,0 a 3,0 nm) con el aumento de  $\alpha$  para todos los lipoplejos y a todas las  $\rho_{eff}$  estudiadas. Este comportamiento es el esperado teniendo en cuenta que a medida que aumenta la fracción molar de CL en el liposoma mixto, la estructura debe contener mayor cantidad de DNA, lo que conlleva a que la separación entre las dobles hélices de DNA disminuya.

**La estructura, el tamaño y la morfología de los liposomas mixtos catiónicos y de los lipoplejos** estudiados en el Artículo 4 también han sido analizados mediante crio-microscopia electrónica de transmisión (crio-TEM). Este estudio se ha realizado a diferentes fracciones molares del lípido catiónico en el liposoma mixto,  $\alpha$  (a  $\alpha = 0,25$  y  $0,5$ )

y a varios valores de  $\rho_{eff} > 1$ , para asegurar que el lipoplejo presente carga neta positiva (requisito indispensable para que en el proceso de transfección los lipoplejos se fusionen con las membranas celulares cargadas negativamente). En la Figuras 8 del Art. 4 se han elegido a modo de ejemplo una serie de micrografías donde se observan numerosas imágenes de lipoplejos en coexistencia con algunos liposomas mixtos (señalados con asteriscos). Estos liposomas mixtos (y otros muchos observados en las micrografías tomadas en ausencia de pDNA, que no se muestran aquí) son esencialmente unilamelares y esféricos, con una bicapa lipídica que se observa nítidamente, y con un diámetro promedio de  $(90 \pm 10) \text{ nm}$ , en buena concordancia con el obtenido mediante el equipo ZetaPALS. Con respecto a los lipoplejos, se observa un claro engrosamiento de las paredes, lo que ha sido atribuido a la formación de estructuras multilamelares constituidas por bicapas lipídicas de liposoma mixto con el pDNA compactado a modo de “sandwich” entre las bicapas, tal como se ha comentado anteriormente y se recoge en el Esquema 2 del Art. 4. Además, la presencia de pDNA induce una agregación que permite la formación de nanoestructuras tipo “cluster”, donde los liposomas mixtos están deformados en la región de contacto con otros liposomas mixtos adyacentes. De este modo, la interacción electrostática parece ser la fuerza conductora de la formación del lipoplejo, confirmando los resultados obtenidos con movilidad electroforética (potencial zeta), electroforesis en gel de agarosa y espectroscopia de fluorescencia con GelRed. Aquellas imágenes donde se observó engrosamiento de las paredes, es decir, patrones multilamelares, se sometieron al programa EMAN,<sup>12</sup> de procesamiento y optimización de señales. Con este programa, se puede analizar si existe periodicidad en el ordenamiento de bicapas lipídicas en dicha disposición multilamellar. Así, para un gran número de imágenes se evaluó la variación en los niveles de grises de la micrografía, relacionados con la densidad electrónica de la muestra, con la distancia a lo largo de una línea que atraviesa perpendicularmente la multilamela (ver Figura 9 del Art. 4). El perfil de picos obtenido para un amplio número de imágenes de estructuras multilamelares confirma la compactación del pDNA mediante una estructura multilamellar tipo “sandwich” y pone de manifiesto una clara periodicidad de bicapas, con valores de distancias interlamelares,  $d$ , obtenidas como promedios sobre la distancia medida entre picos adyacentes de  $(5,0 \pm 0,2) \text{ nm}$ ,  $(5,1 \pm 0,2) \text{ nm}$ ,  $(4,8 \pm 0,2) \text{ nm}$  y  $(4,8 \pm 0,2) \text{ nm}$  para los lipoplejos  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_n/\text{DOPE-pDNA}$ , con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , respectivamente. Estos valores indican que el valor de  $d$  es aproximadamente independiente de la longitud de la cadena alquílica espaciadora entre las dos cabezas

catiónicas del lípido gemini y su valor promedio ( $d \sim 4,9 \text{ nm}$ ) es ligeramente menor (15%) que el valor determinado mediante SAXS para la estructura principal lamelar,  $L_{\alpha, \text{main}}$ .

Es interesante resaltar también que la deformación de las estructuras indica que éstas son suficientemente flexibles y que la interacción liposoma-pDNA es asimétrica a lo largo de la superficie del liposoma mixto, ya que las cargas positivas se compensan parcialmente sólo en una cara de la bicapa, debido a que el DNA es compactado en la superficie de los liposomas reduciendo la cabeza polar efectiva de los CL y provocando una clara asimetría en la presión de empaquetamiento.<sup>13</sup> Este hecho desestabiliza la membrana, fomentando la fusión y/o la agregación de los lipoplejos.<sup>13,14</sup>

Por otro lado, en el Laboratorio del Prof. S. Bhattacharya del Departamento de Química Orgánica del IISc, Bangalore (India), la Doctoranda ha realizado dos estancias breves en las cuáles, junto con varios miembros de su grupo, llevó a cabo los estudios bioquímicos de transfección del pDNA mediante los lipoplejos  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{Amonio})_2\text{C}_n/\text{DOPE-pDNA}$ , con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ . El estudio ha consistido en determinar la viabilidad, el grado de eficiencia y la toxicidad celular de estos lipoplejos cuando son utilizados como vectores coloidales del pDNA. El objetivo final del estudio ha sido confirmar si los vectores coloidales utilizados en este apartado son mejores que los ya conocidos (comerciales o sintetizados en distintos laboratorios, monovalentes o polivalentes). Para realizar este estudio se han utilizado varias técnicas experimentales; (a) la citometría de flujo (FACS), para conocer cuantitativamente la eficiencia de la transfección, bien a partir de la determinación del porcentaje de células transfectadas (% de la proteína GFP expresada), o bien a partir de la intensidad media de fluorescencia de la GFP (MFI) dentro de las células, (b) la microscopia confocal de fluorescencia (CFM), para confirmar visualmente los niveles de expresión de la proteína GFP en las células transfectadas y, (c) un ensayo de reducción de MTT, para la determinación de la % de la viabilidad celular/citotoxicidad al administrar el lipoplejo.

Un objetivo fundamental, previo al proceso de transfección del pDNA, es seleccionar liposomas mixtos que formen lipoplejos estables, que sean capaces de transportar el DNA a través de la membrana hacia el núcleo, con la mínima toxicidad celular posible, pero a la vez que sean capaces de liberar el pDNA en el interior de las células con relativa facilidad, es decir, que sean eficientes vectores de transfección del DNA (eficientes vectores génicos). Por ello, la cantidad de lípido catiónico a utilizar en la formulación debe ser lo más baja posible que permita una transfección del pDNA efectiva.



Por tanto, resulta extremadamente importante determinar la cantidad exacta de lípido catiónico que es necesario utilizar para preparar lipoplejos con carga positiva, que por supuesto sean adecuados para la transfección. Por otro lado, estudios bioquímicos previos<sup>15-17</sup> ya habían mostrado que el plásmido DNA era transfectado a las células con una eficiencia mucho mayor que el DNA lineal. Sin embargo, hasta la fecha, este hecho no había sido experimentalmente verificado ni justificado. Por ello, el punto de inicio de este estudio bioquímico ha consistido en corroborar las evidencias encontradas en el estudio biofísico (menor carga efectiva del pDNA que la nominal que sí posee el ctDNA lineal) y confirmar la viabilidad de los lipoplejos catiónicos ( $\rho_{eff} \geq 1$ ), utilizando para ello los valores de las cargas efectivas,  $q_{L^+}^+$  y  $q_{pDNA}^-$ , determinadas experimentalmente, en el estudio biofísico discutido anteriormente. El estudio de transfección se ha realizado, por primera vez, en las mismas condiciones que el estudio biofísico, en ausencia (-FBS-FBS) y presencia (-FBS+FBS) de suero, y utilizando células HEK293T en la mayoría de los estudios, si bien otras líneas celulares de distintos orígenes (U343, HeLa, H460 y CHO) también han sido transfectadas para contrastar los resultados obtenidos.

La Figura 4 del Art. 3 muestra la eficiencia en la transfección (% GFP y MFI) del pDNA en células HEK293T utilizando el lipoplejo  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2/DOPE$ -pDNA, a  $\alpha = 0,5$ , en un amplio intervalo de valores de  $\rho_{eff}$  ( $0,25 < \rho_{eff} < 4$ , eje x inferior de la Figura 4), considerando la carga efectiva del pDNA determinada mediante el estudio biofísico ( $q_{pDNA}^- = -0,40$ ). Los valores obtenidos muestran una transfección (más apreciable con la MFI) relativamente pequeña a bajas relaciones de carga del lipoplejo y una transfección alta a las relaciones de carga mayores. Sin embargo, si la carga del pDNA fuese la nominal, (es decir, si  $q_{pDNA}^-$  fuese -2), el intervalo cubierto sería  $0,0625 < \rho_{estimado} < 1$  (eje x superior de la Figura 4). Teniendo en cuenta que, para que se produzca transfección apreciable, es necesario que el lipoplejo sea catiónico ( $\rho \geq 1$ ), en este último caso no debería producirse prácticamente transfección alguna puesto que en todos los lipoplejos de la figura se cumple que  $\rho_{estimado} \leq 1$ . En cambio, los valores de transfección de la figura se explican perfectamente si se tiene en cuenta la carga efectiva del pDNA. Así, cuando  $\rho_{eff} < 1$  la eficiencia de la transfección es baja, mientras que para  $\rho_{eff} \geq 1$  la transfección es alta, incluso mayor que la conseguida con Lipofectamina2000, fórmula comercial comúnmente usada como control. Otros ensayos de transfección similares al descrito se han realizado también utilizando las líneas celulares U343, HeLa, H460 y CHO en lugar de células HEK293T. Los valores de transfección obtenidos son cualitativamente

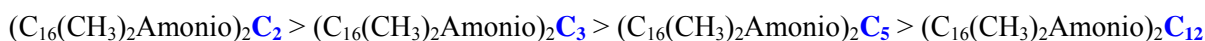
similares (Figura S-9 del Art. 3) y confirman que debe utilizarse la carga efectiva del pDNA, en vez de su carga nominal, para poder interpretar correctamente los valores de transfección obtenidos. En cualquier caso, es conveniente resaltar que del conjunto de resultados de transfección obtenidos con las 5 líneas celulares se puede concluir que el lipoplejo  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2/DOPE$ -pDNA es mejor agente de transfección que el control Lipofectamina2000 en el caso de las células H460, CHO y sobre todo HEK293T.

Abundando en la misma dirección, la microscopía confocal de fluorescencia (CFM), basada en visualizar el % de expresión GFP dentro de las células HEK293T, 48 h después de la transfección, ha confirmado las conclusiones obtenidas con el estudio biofísico y los ensayos bioquímicos de transfección. Inicialmente se debe realizar una tinción (color rojo) de los núcleos celulares con Ioduro de Propidio (PI). Una coloración verde en las imágenes de CFM implica la presencia de GFP dentro de las células, es decir, cuando el pDNA alcanza el núcleo y se ha expresado, mientras que un color anaranjado o amarillento es debido a la superposición del PI y la GFP en los sistemas celulares, lo que significa que en la célula hay pDNA sin liberar junto con pDNA liberado y/o expresado en forma de la proteína GFP. Este criterio de asignación de colores permite evaluar la eficiencia en transfección, en términos de la intensidad de fluorescencia debida a la GFP expresada. Así, en la Figura 5 del Art. 3 se observa claramente una notable eficiencia en la transfección del plásmido (coloración verde debido a la expresión de la GFP dentro de las células) mediante el lipoplejo  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2/DOPE$ -pDNA, a  $\alpha = 0,5$ , y  $\rho_{eff} = 2$ , que no debería producirse si la relación de carga en el lipoplejo fuese la obtenida a partir de la carga nominal del pDNA ( $\rho_{estimado} = 0,4$ ).

En resumen, los resultados de los estudios biofísico y bioquímico son completamente consistentes y confirman por primera vez, de modo cuantitativo, que cuando el pDNA circular superenrollado forma el lipoplejo con los liposomas catiónicos mixtos, es compactado reteniendo un elevado porcentaje de contraiones  $Na^+$ . Por ello, la carga negativa efectiva del plásmido DNA, determinada mediante experimentos biofísicos, es mucho menor que la nominal (-2), y por tanto se va a requerir una menor cantidad de lípido catiónico que la estimada hasta la fecha. En este sentido, esta tesis es pionera en la caracterización de lipoplejos en los que las cargas de los lípidos y pDNA, y por tanto, la carga neta del lipoplejo, son las reales o efectivas en lugar de las nominales erróneamente utilizadas hasta la fecha. Además, se ha mostrado a la comunidad científica una estrategia experimental eficiente y correcta para los futuros estudios de transfección basada en el empleo de formulaciones liposomales que garanticen una completa protección del pDNA y

una óptima transfección con la mínima cantidad de lípido catiónico, lo que implicará una menor toxicidad celular del vector génico administrado.

Con el conocimiento previo de las cargas efectivas de los lípidos catiónicos,  $q_{L^+}$ , de la serie  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n$ , con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , y del pDNA,  $q_{pDNA^-}$ , se ha llevado a cabo el estudio bioquímico de los lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE$ -pDNA, para cuya preparación se ha tenido en cuenta la relación de cargas efectiva,  $\rho_{eff}$ , entre el lípido catiónico y el pDNA en el lipoplejo. Con objeto de encontrar la formulación óptima de cada lipoplejo para su posible utilización *in vivo*, la primera parte del estudio de transfección ha cubierto, para cada uno de los lipoplejos de la serie, todo el intervalo de fracciones molares,  $\alpha$ , y un amplio intervalo de relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , potencialmente adecuadas para la transfección, es decir,  $\rho_{eff} > 1$ , en ausencia de suero (-FBS-FBS), resultados que se recogen en las Figuras S-7 a S-10 del Art. 4. Del análisis de estos resultados ha sido posible localizar las formulaciones óptimas (valores de  $\alpha$  y  $\rho_{eff}$ ) para cada lipoplejo  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE$ -pDNA, con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ . La eficiencia en la transfección, en ausencia de suero (-FBS-FBS), para la serie  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE$ -pDNA, con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , a partir de los valores combinados de % GFP y MFI obtenidos, indican que las formulaciones óptimas (valores de  $\alpha$  y  $\rho_{eff}$ ) para cada lipoplejo con longitud de la cadena alquílica espaciadora de las dos cabezas catiónicas,  $n$ , son: (a) para  $n = 2$  ( $\alpha = 0,5$ ,  $\rho_{eff} = 4,0$ ), (b) para  $n = 3$  ( $\alpha = 0,8$ ,  $\rho_{eff} = 6,1$ ), (c) para  $n = 5$  ( $\alpha = 0,25$ ,  $\rho_{eff} = 2,0$ ) y, (d) para  $n = 12$  ( $\alpha = 0,25$ ,  $\rho_{eff} = 1,2$ ). Además, los valores de % GFP y MFI (Tabla S-5 del Art. 4) en función de la longitud del espaciador,  $n$ , para las formulaciones óptimas indican que la eficiencia en la transfección sigue el orden:



Este comportamiento indica claramente que la longitud de la cadena alquílica espaciadora entre las dos cabezas polares juega un papel crucial en la eficiencia del vector génico, de modo que, en general, la transfección es mayor con espaciadores cortos ( $n = 2$  o  $3$ ) que para largos ( $n = 5$  o  $12$ ). En cualquier caso, sólo algunas formulaciones óptimas consiguen aproximarse, pero en ningún caso superar, la eficiencia en la transfección mostrada por la Lipofectamina2000, utilizada habitualmente como control.

Sin embargo, es bien sabido que los vectores génicos deben actuar en el organismo en el medio fisiológico, por lo que se ha realizado también un segundo estudio de

transfección, ahora en presencia de suero (-FBS+FBS). Para llevarlo a cabo, se ha seleccionado el valor de  $\alpha$  óptimo determinado para cada lipoplejo en ausencia de suero, y se ha repetido el estudio de transfección, ahora en presencia de suero, cubriendo un amplio intervalo de relaciones de cargas efectivas,  $\rho_{eff}$ . Los resultados obtenidos (Figura 10 del Art. 4), han permitido determinar la formulación óptima (valores de  $\alpha$  y  $\rho_{eff}$ ) en presencia de suero, es decir, en medio fisiológico mimetizado, para cada uno de los lipoplejos estudiados. Esta es la formulación terapéutica clave a determinar para su futuro uso en estudios *in vivo*.

La eficiencia en la transfección, en presencia de 10 % de suero (-FBS+FBS), para la serie  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE$ -pDNA, con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , a partir de los valores combinados de % GFP y MFI obtenidos, indican que sólo los lipoplejos con espaciadores  $n = 2$  ( $\alpha = 0,5$ ,  $\rho_{eff} = 4,0$ ) con un  $\sim 80$  % de GFP y una MFI de  $\sim 275$ , y  $n = 3$  ( $\alpha = 0,8$ ,  $\rho_{eff} = 6,1$ ) con un  $\sim 50$  % GFP y con una MFI de  $\sim 50$ , pueden transfectar las células HEK293T con un nivel aceptable (Figura 10 del Art. 4). Estos resultados de transfección indican que durante la transfección mediada por lipoplejos que contienen lípidos catiónicos gémmini con espaciadores largos ( $n = 5$  o  $12$ ) las proteínas con carga negativa del suero compiten con el pDNA asociándose al liposoma mixto catiónico del lipoplejo en mayor medida que lo hace con el liposoma mixto catiónico con espaciadores cortos ( $n = 2$  o  $3$ ), lo que se traduce en una drástica disminución de la eficiencia en la transfección. En cualquier caso, en presencia de suero, la transfección parece ser mejor que en ausencia de suero, siendo el lipoplejo  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2/DOPE$ -pDNA, es decir, el lipoplejo con el lípido gémmini de espaciador más corto ( $n = 2$ ) y con la formulación óptima ( $\alpha = 0,5$ ,  $\rho_{eff} = 4,0$ ) el que es más eficiente, incluso mejor que el control Lipofectamina2000 en presencia de suero, el cuál transfecta con un  $\sim 75$  % de GFP y con una MFI de  $\sim 100$ .

Como ya se ha explicado en el apartado 1.3.2 de esta Tesis, en una etapa temprana del proceso de transfección, la interacción entre los lipoplejos positivos y la membrana celular negativa depende de la presencia de lípido coadyuvante, de la estructura del lipoplejo, y de la vía de entrada en las células, siendo la endocitosis la más eficiente. También se ha descrito en ese mismo apartado que los lipoplejos con estructura lamelar permanecen bastante estables en el interior de los endosomas, siendo relativamente bajo el grado de liberación del pDNA en el citoplasma celular, mientras que los lipoplejos con estructura hexagonal se fusionan mejor con la membrana endosomal aniónica, liberando más fácilmente el pDNA, lo que conlleva una mayor eficiencia en la transfección. En particular, el lípido coadyuvante, DOPE, utilizado en esta Tesis, favorece la formación de

la estructura hexagonal invertida a bajos valores de  $\alpha$  (alta fracción molar de DOPE). Sin embargo, la estructura hexagonal no ha sido detectada en ninguno de los lipoplejos de la serie estudiada, a ningún valor de  $\alpha$ , aunque sí se ha encontrado para los lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE$ -pDNA, con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , constituidos por lípidos catiónicos gemini con cabezas polares tipo imidazol, estudiados recientemente por el grupo.<sup>8</sup> No obstante, el estudio estructural de los lipoplejos mediante SAXS sí se ha encontrado por primera vez la coexistencia de 2-3 estructuras lamelares, sobre todo para lipoplejos que contienen lípidos gemini con cadenas alquílicas espaciadoras cortas ( $n = 2$  o  $3$ ) y a fracciones molares del CL,  $\alpha$ , moderadas o bajas ( $\alpha \leq 0,5$ ). Puesto que son estos lipoplejos ( $n = 2$  o  $3$ , y  $\alpha \leq 0,5$ ) los que, en general, ofrecen una mejor eficiencia en la transfección del pDNA, una justificación de esta mayor transfección podría ser la presencia de dos o más fases lamelares coexistentes, lo que probablemente podría provocar un efecto sinérgico en el proceso de transfección.

La formulación óptima determinada para el mejor lipoplejo encontrado, es decir, el  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2/DOPE$ -pDNA, con  $\alpha = 0,5$ , ha sido utilizada para transfectar el pDNA, en presencia de 10 % de suero, en otras cuatro líneas celulares (U343, HeLa, H460 y CHO), siguiendo el mismo protocolo utilizado en la transfección sobre la línea celular HEK293T. Los resultados obtenidos (Figura S-11 del Art. 4) a distintos valores de relaciones de cargas efectivas,  $\rho_{eff} > 1$ , indican que el valor óptimo de la carga efectiva es  $\rho_{eff} = 4,0$  para las cuatro líneas celulares. Cuando se han utilizado las células H460 y CHO, la eficiencia en la transfección con los 4 lipoplejos de la serie ha resultado ser bastante mejor que la de la Lipofectamina2000, mientras que en el caso de las células U343 y HeLa la transfección es comparable a la del control.

Los resultados de transfección obtenidos mediante el ensayo de citometría de flujo (FACS) han sido contrastados con los obtenidos mediante microscopía confocal de fluorescencia (CFM). Las micrografías de los lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE$ -pDNA, a  $\alpha = 0,5$  y en presencia de un 10 % de suero (Figuras 12 y S-13 del Art. 4), indican que el % GFP expresado en las células en función de la longitud de la cadena espaciadora,  $n$ , entre las dos cabezas catiónicas del lípido gemini utilizado en la preparación de los lipoplejos sigue el orden:  $n = 2 > n = 5 > n = 3 > n = 12$ . Estos resultados confirman de nuevo al lipoplejo  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2/DOPE$ -pDNA, a  $\alpha = 0,5$ , como el vector génico del pDNA más adecuado de los cuatro lípidos catiónicos de la serie estudiados en esta Tesis, incluso mejor (más coloración verde) que el control Lipofectamina2000, lo que es consistente con los resultados obtenidos mediante el estudio de citometría de flujo (FACS).

La microscopia confocal de fluorescencia confirma de nuevo que la longitud de la cadena alquílica espaciadora de los CL gemini juega un papel clave a la hora de determinar la eficiencia en la transfección, siendo los espaciadores cortos los que conducen a una mayor transfección.

A la hora de seleccionar un vector génico para su utilización en terapia génica no sólo se debe valorar el que posea una notable eficiencia como agente transfectante sino que además debe provocar la menor toxicidad en las células sobre las que se administre, es decir, con su presencia debe mantenerse una elevada viabilidad celular. Por ello, cualquier estudio de transfección debe venir acompañado de un análisis de la viabilidad celular/citotoxicidad provocada por el vector (en esta Tesis el lipoplejo) utilizado en la transfección. Uno de los métodos más comunes utilizados para determinar el grado de toxicidad celular está basado en un ensayo de reducción del MTT, (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio). Con este método se ha determinado la biocompatibilidad de los cuatro lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-pDNA$ , con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , a varias relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , potencialmente adecuadas ( $\rho_{eff} > 1$ ), y a diferentes fracciones molares del CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , cuando son transfectados a las células HEK293T. Con este ensayo se ha obtenido el % de células viables que han crecido y se han multiplicado, 48 h después de transfectar el lipoplejo en las células (Figuras 11 y S-12 del Art. 4). Teniendo en cuenta que, a menor toxicidad producida por el lipoplejo, mayor será el % de GFP expresado en las células y mayor la MFI, (debido a una mayor liberación de pDNA en la célula), los resultados obtenidos indican que todos los lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-pDNA$ , a cualquier fracción molar del CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y a cualquier relación de cargas efectivas,  $\rho_{eff} > 1$ , son claramente menos tóxicos que el control Lipofectamina2000. De hecho, la viabilidad celular en presencia de los lipoplejos de la serie es elevada (~70-110) %, siendo en todos los casos mucho mayor que en presencia de Lipofectamina2000 (~55 %). La viabilidad celular en presencia de los lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-pDNA$ , en función de la longitud de la cadena espaciadora,  $n$ , entre las dos cabezas catiónicas del lípido gemini, está poco influenciada por el valor de la fracción molar del CL,  $\alpha$ . Además, dicha viabilidad celular, para cada lipoplejo de la serie conteniendo el CL gemini  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n$ , a los valores óptimos de  $\alpha$  determinados mediante los experimentos de transfección, sigue el siguiente orden decreciente:  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2$  ( $\alpha = 0,50$ )  $>$   $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_5$  ( $\alpha = 0,25$ )  $>$   $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_3$  ( $\alpha = 0,80$ )  $>$   $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_{12}$  ( $\alpha = 0,25$ ). Es decir, el orden en el grado de citotoxicidad es el opuesto. Estos resultados siguen el mismo hábito

que el mostrado por el estudio de transfección (Figuras 10 y S-7 a S-11 del Art. 4). En este sentido, y retomando las Figuras 12 y S-12 del Art. 4 de microscopia confocal de fluorescencia, se confirma que en estos lipoplejos la longitud,  $n$ , del espaciador alquílico entre las cabezas catiónicas del lípido gemini, tiene también un notable efecto en el tamaño celular, ya que el tamaño de las células observado para lípidos gemini con espaciadores largos ( $n$  alto) es menor, lo que puede ser debido a una mayor citotoxicidad del vector coloidal utilizado.

En resumen, se puede afirmar que todas las formulaciones preparadas son altamente biocompatibles como han confirmado los estudios *in vitro* de los distintos cultivos celulares. En cualquier caso, el estudio de viabilidad celular/citotoxicidad concluye que el lipoplejo menos tóxico (el más viable) es el de espaciador más corto ( $n = 2$ ), es decir,  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_2/DOPE$ -pDNA, a  $\alpha = 0,50$ , justo el mismo que ofrece la mayor eficiencia en la transfección del pDNA.

Por tanto, se puede concluir que la eficiencia en la transfección de estos lipoplejos formados por lípidos gemini, conteniendo dos cabezas catiónicas de amonio separadas por una cadena alquílica espaciadora de  $n$  metilenos, se ve altamente afectada por: (a) la fracción molar del lípido catiónico,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, (b) la relación de cargas efectiva,  $\rho_{eff}$ , (c) la longitud del espaciador,  $n$ , que une las dos cabezas catiónicas y (d) la estructura y morfología del lipoplejo, siendo un factor favorable la coexistencia de estructuras lamelares,  $L_\alpha$ . Además, estudios recientes del grupo para los lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Imidazol)_2C_n/DOPE$ -pDNA, con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , constituidos por lípidos gemini catiónicos con cabezas polares tipo imidazol, han puesto de manifiesto que el tipo y tamaño de las cabezas polares también juega un papel importante.<sup>8</sup> Podemos concluir, por tanto, que los lipoplejos constituidos por lípidos gemini catiónicos presentan una eficiencia en la transfección considerablemente mayor que la de los lipoplejos basados en CL de una cabeza polar, debido a que forman una estructura más estable que protege mejor el pDNA de las proteínas del suero y de las DNAsas durante el proceso de transfección génica. Todo ello unido a un considerablemente menor grado de toxicidad celular, les hace ser considerados válidos y bastante mejores que los lípidos actualmente conocidos, comerciales o de diseño, tanto para los estudios *in vitro* como para futuros ensayos *in vivo*.

### 3.2.3. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Dias, R. S.; Lindman, B. *DNA Interaction with Polymers and Surfactants*; Wiley & Sons: Hoboken, **2008**.
- (2) Caracciolo, G.; Marchini, C.; Pozzi, D.; Caminiti, R.; Amenitsch, H.; Montani, M.; Amici, A. *Langmuir* **2007**, *23*, 4498.
- (3) Rodríguez-Pulido, A.; Martín-Molina, A.; Rodríguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648.
- (4) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7764.
- (5) Muñoz-Úbeda, M.; Misra, S. K.; Barrán-Berdón, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Sierra, M. B.; Biswas, J.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18014.
- (6) Barrán-Berdón, A. L.; Muñoz-Úbeda, M.; Aicart-Ramos, C.; Pérez, L.; Infante, M. R.; Castro-Hartmann, P.; Martín-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7368.
- (7) Muñoz-Úbeda, M.; Misra, S. K.; Barrán-Berdón, A. L.; Datta, S.; Aicart-Ramos, C.; Castro-Hartmann, P.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *Biomacromolecules* **2012**, [dx.doi.org/10.1021/bm301066w](https://doi.org/10.1021/bm301066w).
- (8) Misra, S. K.; Muñoz-Úbeda, M.; Datta, S.; Barrán-Berdón, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Castro-Hartmann, P.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, en preparación.
- (9) Muñoz-Úbeda, M.; Rodríguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Martín-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3332.
- (10) Muñoz-Úbeda, M.; Rodríguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Llorca, O.; Quesada-Pérez, M.; Martín-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Soft Matter* **2011**, *7*, 5991.
- (11) Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 915.
- (12) Ludtke, S. J.; Baldwin, P. R.; Chiu, W. J. *Struct. Biol.* **1999**, *128*, 82.
- (13) Huebner, S.; Battersby, B. J.; Grimm, R.; Cevc, G. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 3158.
- (14) Lentz, B. R. *Chem. Phys. Lipids* **1994**, *73*, 91.
- (15) Cherng, J. Y.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; Jiskoot, W.; Talsma, H.; Zuidam, N. J.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A. J. *Controlled Release* **1999**, *60*, 343.
- (16) von Groll, A.; Levin, Y.; Barbosa, M. C.; Ravazzolo, A. P. *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 1220.
- (17) Chancham, P.; Hughes, J. A. J. *Liposome Res.* **2001**, *11*, 139.





# CAPÍTULO 4

## *ASPECTOS MÁS RELEVANTES Y CONCLUSIONES*



Aunque en el apartado anterior de esta Tesis se han ido exponiendo parte de las conclusiones junto con la discusión de los resultados, a continuación se resumen las más relevantes. El estudio realizado en esta Tesis se ha dividido en dos grandes grupos en función del lípido catiónico utilizado para formar los lipoplejos:

a) Lipoplejos formados por DNA lineal (ctDNA) y liposomas mixtos constituidos por un lípido catiónico comercial con una cabeza polar, y un lípido zwitteriónico (DOPE) que actúa como lípido coadyuvante, a diferentes fracciones molares de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y cubriendo un amplio intervalo de relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , entre el lípido catiónico y el DNA.

b) Lipoplejos formados por un plásmido DNA circular superenrollado (pDNA) y liposomas mixtos constituidos por un lípido catiónico gemini de la serie  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-DNA$ , siendo  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , todos sintetizados en esta Tesis, y un lípido zwitteriónico (DOPE), a diferentes fracciones molares,  $\alpha$ , y cubriendo un amplio intervalo de relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ .

Del estudio biofísico de los lipoplejos formados por DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA, cuyos CL poseen una sola cabeza monovalente, las conclusiones más importantes han sido:

1. Los valores de la movilidad electroforética, el potencial zeta y/o la densidad de carga superficial, para diferentes relaciones  $L/D$  del lipoplejo, siguen un hábito sigmoideal, que además implica un cambio de signo de cualquiera de las tres propiedades analizadas. Esta inversión de carga confirma que las interacciones liposoma mixto-DNA ocurren superficial y electrostáticamente. Además, el proceso de formación del lipoplejo también se ve favorecido por la ganancia de entropía que se produce con la liberación de los contraiones  $Na^+$  (del DNA) y  $Cl^-$  (del CL) al formarse el lipoplejo. Los lipoplejos preparados a una relación  $L/D > (L/D)_\phi$ , es decir, con carga neta positiva, son los potencialmente eficaces para ser utilizados como vectores de transferencia del DNA a las células. Los ensayos de intercalación de la sonda fluorescente bromuro de etidio (EtBr), realizados con el lipoplejo DOEPC/DOPE-ctDNA, han corroborado los valores de  $(L/D)_\phi$ , obtenidos con el potencial zeta.
2. Las temperaturas de transición gel-fluido,  $T_m$ , del lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA, determinadas mediante la anisotropía de fluorescencia, confirman que la presencia del DOPE disminuye la  $T_m$  de la mezcla lipídica. A medida que aumenta la fracción molar de CL,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, disminuye la anisotropía,  $r$ , lo

- que significa que la bicapa lipídica se hace más fluida, y por tanto, es potencialmente más eficiente en la transfección.
3. La estructura de los lipoplejos, DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA, determinadas mediante la técnica de SAXS, indica que los dos lipoplejos, a  $\alpha = 0,2$  y a las distintas relaciones de carga analizadas, presentan una estructura hexagonal inversa,  $H_{II}^C$ , mientras que a  $\alpha \geq 0,4$  presentan una estructura lamelar,  $L_\alpha$ , en la que el DNA está compactado formando un “*sandwich*” entre cada dos bicapas lipídicas.
  4. En ambos lipoplejos, la periodicidad,  $d$ , de la estructura lamelar se mantiene prácticamente constante e independientemente de  $\rho_{eff}$ , de  $\alpha$ , y de  $L/D$ . Además, el valor obtenido del espesor de la capa acuosa,  $d_w$ , es apropiado para alojar al ctDNA. Por otro lado, la correlación DNA-DNA, es decir, el espacio entre las dobles hélices de DNA consecutivas,  $d_{ctDNA}$ , muestra una ligera disminución, tanto al aumentar  $\alpha$  como  $\rho_{eff}$ . El valor de la periodicidad ( $d = a = d_{ctDNA}$ ), en la estructura hexagonal es prácticamente constante y mayor que el valor obtenido en la estructura lamelar, lo que indica que en la estructura hexagonal las dobles hélices de DNA están más separadas.
  5. Las micrografías de crio-TEM han confirmado la estructura lamelar encontrada con SAXS. Además, ha permitido analizar el tamaño y la morfología de los lipoplejos, mostrando estructuras multilamelares en forma de “*clusters*”. Por medio de un tratamiento de imágenes, se ha determinado los valores de  $d$ , corroborando los resultados obtenidos con SAXS y confirmando que, en la estructura lamelar, el DNA se encuentra formando un “*sandwich*” entre cada dos bicapas lipídicas.
  6. El modelo semiempírico aplicado al lipoplejo DC-Chol/DOPE-ctDNA es capaz de explicar los procesos de agregación/desagregación de los lipoplejos, así como construir su diagrama de fases a partir de los valores de  $S_a(P)$  (a  $L/D < (L/D)_\phi$ ),  $S_d(P)$  (a  $L/D > (L/D)_\phi$ ), y el valor de la electroneutralidad,  $S_\phi(P)$ , obtenidos a partir de las gráficas experimentales de potencial zeta. Los diagramas de fase muestran una elevada dependencia con el valor de la fracción molar,  $\alpha$ , del CL en el liposoma mixto. Así,  $S_\phi(P)$ ,  $S_a(P)$  y  $S_d(P)$ , y el intervalo de concentración en el que se forman los “*clusters*”, disminuye a medida que aumenta  $\alpha$ , estando los valores en buena concordancia con los obtenidos experimentalmente mediante el estudio biofísico.
  7. La aplicación del modelo de renormalización de cargas aplicado en esta Tesis a los lipoplejos DC-Chol/DOPE-ctDNA y DOEPC/DOPE-ctDNA, y basado en el

modelo de agregación-desagregación pero utilizando la carga normalizada del liposoma mixto, permite estimar la carga teórica renormalizada de los lipoplejos. Esta carga renormalizada sigue un comportamiento frente a la concentración de liposoma mixto (a [DNA] constante), en buena concordancia con las curvas sigmoidales de potencial zeta obtenidas experimentalmente. El modelo de renormalización de cargas predice un valor más real de la electroneutralidad, ya que para obtener el volumen total del lipoplejo tiene en cuenta los volúmenes molares parciales de la disolución tamponada, del DNA, y del liposoma mixto.

8. Como conclusión final del primer bloque de la Tesis, se puede decir que los liposomas mixtos DC-Chol/DOPE y DOEPC/DOPE compactan y condensan el ctDNA de manera eficiente por medio de una interacción superficial y electrostática; forman estructuras hexagonales inversas a bajos valores de fracción molar de CL,  $\alpha$ , potencialmente más eficientes en la transfección del biopolímero, y estructuras lamelares a moderados-altos  $\alpha$ , estando los resultados teóricos en buena concordancia con los obtenidos experimentalmente con una amplia variedad de métodos experimentales. Por todo ello, se puede concluir que los liposomas mixtos analizados en este apartado son vectores coloidales potencialmente aptos para transfectar el DNA en terapia génica.

Para los lipoplejos de la serie  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-DNA$  con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , en donde los CL gemini poseen dos cabezas polares y  $n$  es la longitud de la cadena alquílica espaciadora que las une, las conclusiones más destacadas son:

1. A partir de las curvas sigmoidales de potencial zeta se ha determinado de forma experimental, la relación  $L/D$  en la electroneutralidad,  $(L/D)_\phi$ . El brusco cambio de signo del potencial zeta corrobora que existe una interacción liposoma mixto-DNA superficial y electrostática.
2. A partir de las curvas de potencial zeta se ha determinado experimentalmente, por primera vez, el valor de las cargas efectivas del lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , que ha resultado ser coincidente con su valor nominal (+1 para los CL monovalentes y +2 para los CL divalentes), y del pDNA,  $q_{pDNA}^-$ , cuyo valor promedio obtenido  $(-0,45 \pm 0,15)$  es considerablemente menor (en valor absoluto) que la del DNA lineal,  $q_{ctDNA}^- = -2$ . Por ello, los liposomas mixtos compactan el pDNA con parte de sus contraiones  $Na^+$  asociados, de modo que al poseer el pDNA menor carga

efectiva, se requerirá también una menor cantidad de liposoma mixto catiónico para compactarlo. Este hecho supone que el lipoplejo óptimo para su uso en la transfección será menos citotóxico. Los resultados obtenidos con el potencial zeta han sido confirmados con los experimentos biofísicos de electroforesis en gel de agarosa y de espectroscopia de fluorescencia de la sonda GelRed, y también mediante los estudios bioquímicos basados en la citometría de flujo (FACS) y la microscopia confocal de fluorescencia.

3. El estudio de SAXS de los lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-DNA$  con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , en un amplio intervalo de valores de  $\alpha$  y de  $\rho_{eff}$  estudiadas, han mostrado por primera vez, la presencia de 3 estructuras lamelares coexistentes en un mismo lipoplejo. Una estructura lamelar principal,  $L_{\alpha,main}$ , que aparece en todo el intervalo de valores de  $\alpha$ , otra estructura en la región rica en DOPE,  $L_{\alpha,DOPErich}$ , y una 3ª estructura en la región rica en lípido gemini catiónico,  $L_{\alpha,CLrich}$ .
4. Las micrografías de crio-TEM han revelado que los lipoplejos catiónicos están constituidos por nanoestructuras multilamelares, en muchos casos asociados en forma de “clusters”, donde el pDNA está formando un “sandwich” entre cada dos bicapas lipídicas, cuyo espaciado,  $d$ , es consistente con el valor y la estructura determinada con SAXS. Además se ha confirmado que la fracción molar de CL,  $\alpha$ , en el liposoma mixto juega un papel importante en la morfología final del lipoplejo.
5. En ausencia y presencia de suero, se han determinado las formulaciones óptimas, es decir, la fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y la relación de cargas efectiva,  $\rho_{eff}$ , para cada lipoplejo de la serie, que conducen a una óptima eficiencia en la transfección y una baja citotoxicidad del lipoplejo.
6. El lipoplejo  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-DNA$  con espaciador  $n = 2$ , en presencia de suero, muestra una mayor eficiencia en la transfección que los lipoplejos de la misma serie pero con espaciadores más largos ( $n = 3, 5$  o  $12$ ), incluso mejor que el control Lipofectamina2000. Este comportamiento se repite también cuando la transfección se realiza utilizando otras líneas celulares, como H460, CHO, HeLa y U343.
7. La alta viabilidad celular/bajo nivel de citotoxicidad mostrada por los lipoplejos  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio)_2C_n/DOPE-DNA$ , con  $n = 2, 3, 5$  o  $12$ , confirma un alto

grado de biocompatibilidad a cualquier valor de la fracción molar de CL,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, y de la relación de cargas efectiva,  $\rho_{eff}$ , sobre todo para los lipoplejos con espaciadores cortos ( $n = 2$  y  $3$ ), que son los que transfectan más eficientemente.

8. Los resultados obtenidos mediante los ensayos de transfección y de viabilidad celular han sido corroborados con la microscopia confocal de fluorescencia, que confirma la presencia de la proteína GFP expresada en el interior de las células al ser transfectadas con el plásmido pEGFP-C3 DNA.
9. La moderada-elevada eficiencia de la transfección en lipoplejos con lípidos gemini con espaciadores cortos ( $n = 2$  y  $3$ ) probablemente puede ser debida a la presencia de dos o más estructuras lamelares coexistentes, lo que podría actuar como efecto sinérgico potenciando la eficiencia de transfección y favoreciendo que el plásmido DNA se libere más fácilmente en el citoplasma.
10. Las formulaciones óptimas de liposoma mixto-pDNA, es decir, aquellas con bajos valores de fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y lípido catiónico gemini con espaciadores cortos, ( $n = 2$  o  $3$ ), caracterizadas en esta Tesis, han demostrado ser biocompatibles en cultivos celulares *in vitro*.

Para finalizar, si hubiera que destacar las contribuciones más importantes de esta Tesis se remarcarían las siguientes:

i. La utilización, por primera vez, de un plásmido de DNA tanto en el estudio biofísico como en el bioquímico. Esta metodología ha mostrado que para alcanzar conclusiones satisfactorias y, sobre todo, correctas, ambos estudios, biofísico y bioquímico, no pueden ser llevados a cabo de forma independiente, sino que deben realizarse de forma coordinada y complementaria. Además, se ha confirmado que la suposición de que el DNA lineal y el plásmido de DNA se comportan por igual es completamente errónea.

ii. Es fundamental trabajar con cargas efectivas tanto para el lípido catiónico,  $q_{L^+}^+$ , como para el biopolímero,  $q_{pDNA}^-$ , y, por consiguiente, con razones de carga efectivas,  $\rho_{eff}$ , ya que sólo de esta forma se tiene en cuenta la posibilidad de que uno, otro, o los dos no aporten el 100 % de su carga nominal. Éste ha sido el caso del plásmido utilizado, que aporta tan sólo algo menos del 25 % de su carga nominal por par de bases, hecho que ha resultado ser trascendental en el sentido de que ha permitido rebajar considerablemente la



cantidad de lípido catiónico necesario para formar lipoplejos cargados positivamente, y, por tanto, potencialmente apropiados para transfectar el pDNA. Este aspecto es de crucial importancia en terapia génica, puesto que el objetivo de la investigación en lipofección es encontrar formulaciones lipídicas que conjuguen una óptima eficiencia en transfección celular con una mínima citotoxicidad.

Por todo ello, esta Tesis supone un avance importante no sólo en el conocimiento del proceso de formación de lipoplejos y en su utilización como vectores no virales del DNA, sino en su potencial aplicación en futuros ensayos *in vivo* en terapia génica.

## ANEXO

### 1. SÍNTESIS DE LOS LIPOSOMAS CATIONICOS GEMINI.

Los lípidos gemini con cabeza polar amonio se sintetizaron adicionando *N,N,N',N'*-tetrametilendiamina (20 mmol, 3,01 mL) y un exceso de bromuro de *n*-hexadecil (20 g), y calentándolo en etanol bajo reflujo hasta que toda la diamina se consumió ( $\approx$  48 horas). Tras eliminar el disolvente por evaporación, el residuo sólido fue recrystalizado dos veces en acetona seca. El producto resultante se disolvió en un volumen pequeño de una mezcla de hexano/acetato de etilo al menos 3 veces para eliminar el exceso de bromuro de *n*-hexadecil y su pureza fue determinada mediante TLC y  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).<sup>1</sup>

### 2. SÍNTESIS DEL PLÁSMIDO CIRCULAR *pEGFP-C3*.

Este plásmido se obtuvo de las células de la bacteria *E. coli*, *DH5 $\alpha$* . Un primer cultivo de 10 mL de medio LB (*Luria Broth*) en presencia de 100  $\mu\text{g/mL}$  de Kanamicina, fue inoculado con una colonia sencilla e incubado toda la noche a 37 °C mientras se agitaba a 230-245 rpm. Este cultivo de 10 mL se utilizó para inocular 50 mL de LB con 100  $\mu\text{g/mL}$  de Kanamicina, el cuál creció a 37 °C mientras se agitaba durante 9 horas. A continuación, 60 mL del cultivo se utilizó para inocular 2 frascos de 2 L que contenían 1 L de LB con 100  $\mu\text{g/mL}$  de Kanamicina. Los cultivos crecieron a 37 °C con agitación a 230-245 rpm durante 15-18 horas antes de cultivar las células por centrifugación a 7000 rpm, a 4 °C durante 15 min en un rotor F10S (Sorvall, Norwalk, USA). El "pellet" bacteriano húmedo se congeló como películas finas que se almacenaron a -20 °C hasta llevar a cabo el Gigaprep (2 L de LB para cada Gigaprep). La purificación del plásmido se realizó utilizando el GenElute HP Select Plasmid Gigaprep Kit de Sigma-Aldrich. El pDNA recuperado mediante electroforesis en gel de agarosa fue en su mayoría de conformación superenrollada. La recuperación y pureza del pDNA se ha realizado mediante un análisis espectrofotométrico. El eluyente recuperado de cada cinco Gigaprep fue liofilizado a partir de la concentración más elevada de plásmido.<sup>2</sup>

La pureza del DNA lineal y superenrollado, se determinó con la técnica de espectroscopía UV-visible, con un espectrómetro UV-2550/PC (Shimadzu Corp., Ltd., Japón), a una concentración de 0,1 mg/mL. Sabiendo que la longitud de onda máxima para ambos DNAs es de 258 nm y teniendo en cuenta el valor de la bibliografía<sup>3-5</sup> para  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , la concentración de DNA de 0,1 mg/mL equivale a  $1,18 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  en pares de bases para el DNA lineal y a  $7,69 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  para el plásmido DNA.<sup>4-8</sup>

Además, con la técnica de electroforesis en gel de agarosa se obtuvo información sobre el nivel de fragmentación, longitud y tamaño de ambos DNA, lineal y superenrollado. Esto se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la UCM.<sup>2</sup> Sobre una célula electroforética (Renner GmbH, Alemania) se solidificó gel agarosa *D-I Medium EEO* (Laboratorios CONDA, España) disuelto al 0,7 % en la disolución buffer 1x TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,2) adquirido de Sigma-Aldrich. Inc. (EE.UU), que además está provisto de un peine de metacrilato que realiza pequeños agujeros en el gel, en donde se adiciona la disolución de DNA. Se procedió a la dilución de una alícuota de DNA 0,1 mg/mL en HEPES, en un tampón de aplicación 6X, que está compuesto de 30 % de glicerol con azul de bromofenol y cianol de xileno (al 0,25 % ambos) suministrados por USB Corp., EE.UU., utilizándose como marcadores de la electroforesis. Esta disolución se adicionó a uno de los agujeros del gel agarosa, mientras que en otro agujero se adicionó una alícuota de un patrón de DNA *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Fermentas International, Inc., Canadá). Antes de adicionar las disoluciones en las hendiduras se deben teñir con una disolución de 0,5 µg/mL de *Bromuro de Etidio*, EtBr, que es una sonda que emite fluorescencia cuando se intercala entre los pares de bases del DNA. A continuación se aplicó a la célula electroforética una diferencia de potencial de 100 mV durante 30 min y se produjo el desplazamiento de los segmentos de DNA, cargados negativamente, hacia el polo positivo a lo largo del gel agarosa. Este proceso conlleva a la separación de los segmentos en función del tamaño, puesto que la estructura del gel impide estéricamente el avance del DNA. Cuanto mayor es el fragmento de DNA menor es su desplazamiento. Finalmente el gel agarosa se revela bajo luz ultravioleta a 365 nm durante 300 ms. Teniendo en cuenta que la intensidad de emisión del EtBr es proporcional al número de fragmentos de DNA que se encuentran en esa posición del gel, se ha obtenido un tamaño promedio de 2700 pares de bases (bp) por fragmento para el DNA lineal (ctDNA), y de 4700 bp para el plásmido DNA (pDNA), obteniéndose en ambos casos una moderada polidispersidad en los tamaños.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- **Potencial Zeta.**

En primer lugar, con el fin de llevar a cabo la mezcla liposoma-DNA, se preparó por pesada una disolución de DNA 0,1 mg/mL (ctDNA o pDNA) en PBS (150 mM) o HEPES (40 mM). La relación  $A_{260} / A_{280} = 1,90$  y la absorbancia despreciable a 320 nm

( $A_{320} = -0,003$ ), dos parámetros que habitualmente son utilizados en la bibliografía como indicadores de pureza,<sup>9-13</sup> evidencian que la contaminación por proteínas del DNA utilizado en este trabajo es despreciable.

A continuación se mezclaron las disoluciones de liposoma mixto y DNA; para ello, se adicionó 0,8 mL de la disolución de liposomas en un vial provisto de un agitador magnético, y se procedió a adicionar, gota a gota durante 5 min, 0,8 mL de la disolución de DNA preparada anteriormente, con agitación vigorosa y a una velocidad de adición de 0,2 mL/min. Transcurrido este tiempo, se agitó la mezcla durante 10 minutos para favorecer la formación de los lipoplejos. Se adicionó el DNA sobre el liposoma en todos los casos.<sup>3,14</sup> Una vez formados los complejos, todas las disoluciones de lipoplejos se mantuvieron a temperatura ambiente y en reposo durante al menos 20 min antes de realizar el experimento.

La concentración de liposoma total, suma de la concentración del lípido catiónico y del zwitteriónico varió entre 0,07 y 1,5 mg/mL, mientras que la concentración de DNA se mantuvo constante e igual a 0,05 mg/mL. De esta manera, se realizaron estudios a varias fracciones molares de lípido catiónico en el liposoma mixto ( $\alpha = 0,25; 0,5; 0,75$  y 1 para liposomas de un solo grupo polar; y  $\alpha = 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8$  y 1 para los gemini con 2 grupos polares amonio) de las disoluciones de lipoplejos, cuya relación  $L/D$  varió entre  $0,8 < L/D < 15$  y  $0,05 < L/D < 10$ , respectivamente.

- ***Electroforesis en Gel de Agarosa.***

Se prepararon una serie de disoluciones de lipoplejos con plásmido DNA. Estos se adicionaron en los pocillos del gel agarosa al 1 %, el cual se prepara a partir de una mezcla de 1 g de agarosa con 100 mL de 1x TAE (Tris-HCl, Acetato y EDTA) disolución reguladora (1 g agarosa/100 mL de disolución reguladora) y con 100  $\mu$ L de la sonda fluorescente, EtBr. La disolución se introduce en el microondas durante 3 min hasta que queda homogénea. La disolución se deja enfriar a unos 50 °C, y se vierte sobre el soporte sellado, provisto de unos peines de plástico que harán los pocillos en el gel agarosa, y se deja polimerizar durante 30 min. A continuación, se retiran los peines de plástico y se va añadiendo el volumen necesario de disolución de lipoplejo cubriendo una relación  $L/D$  de 0.125 a 4. Como control se adiciona una disolución de pDNA con EtBr sin liposoma mixto. En todos los pocillos se adiciona una cantidad constante de 200 ng de pDNA y 73 ng/ $\mu$ L de liposoma catiónico, variando sólo el volumen de DOPE y de disolución reguladora que se adiciona en cada eppendorf, según sea la relación  $L/D$ . A continuación,

se centrifuga durante 2 s para que se forme el lipoplejo y se deja reposar durante 30 min. Pasado este tiempo se adicionan 3  $\mu\text{L}$  de tinte con EtBr, se centrifuga durante 2 s y se introducen uno a uno en su pocillo correspondiente del gel agarosa, el cual se encuentra cubierto por la disolución reguladora 1x TAE.

Finalmente, se pasa una corriente eléctrica de 100 mV durante 30 min, tiempo suficiente para hacer fotografías bajo exposición de luz ultravioleta durante 300 ms.

La intensidad de la banda fluorescente se mide a través del software *Alfa-Digi-Doc* provisto del instrumento Gel-Doc. La banda de intensidad del DNA libre fue considerada de un 100 %, por lo que el resto de las intensidades se calcularon de acuerdo a este valor.

### • *Espectroscopía de Fluorescencia*

#### 1. *Experimentos de intercalación de EtBr*

La técnica de fluorescencia se ha utilizado para determinar el tipo de interacción que tiene lugar entre el DNA y los liposomas constituidos por DOEPC/DOPE, DC-Chol/DOPE y  $(\text{C}_{16}(\text{CH}_3)_2\text{A}^+)_2\text{C}_n/\text{DOPE}$  (siendo  $n = 2, 3, 5$  ó  $12$  y  $\text{A}^+$  el grupo catiónico amonio).

Antes de realizar las medidas, se realizaron ensayos previos que permitieron fijar los parámetros espectrales óptimos:

- i. La longitud de onda de excitación fue elegida a 520 nm dado que a esta  $\lambda_{\text{exc}}$  los coeficientes de extinción molar de la sonda utilizada, libre y asociada al DNA, son iguales:  $\epsilon_{\text{EtBr}} = \epsilon_{\text{EtBr-DNA}}$ .
- ii. El espectro de emisión se recogió desde 530 hasta 700 nm.
- iii. La rendija de excitación fue fijada a 2,5 nm, mientras que la de emisión se fijó a 5,0 nm.
- iv. La velocidad de barrido fue de 240 nm/min.

#### - Sistema DOEPC/DOPE-ctDNA

Anteriormente al mezclado y a las mediciones (48 horas), se preparó una disolución madre en PBS, de DNA ( $D$ ), con el fin de conseguir la completa disolución del biopolímero, y una disolución concentrada de EtBr. A partir de ellas, se preparó por dilución una disolución ( $D + \text{EtBr}$ ), de tal manera que las concentraciones finales de DNA y EtBr fuesen 0,050 y 0,005 mg/mL, respectivamente, manteniendo así la relación molar DNA:EtBr superior a 6:1. De este modo se consigue que la disminución de la fluorescencia por el aumento de la concentración de lípido sea lineal.<sup>15</sup> A continuación, tal y como se

específica en el apartado 2.2 se preparó una disolución liposómica, y las disoluciones de lipoplejos en presencia de sonda fluorescente, asegurando que las concentraciones finales de DNA y de EtBr se mantuviesen constantes y la relación lípido/DNA en la disolución ( $L+D+EtBr$ ) fuese  $L/D=30$ ,  $L/D=20$ ,  $L/D=18$  y  $L/D=16$ , respectivamente, para composiciones del liposoma mixto de  $\alpha = 0,25$ ;  $0,5$ ;  $0,75$  y  $1$ .

Una vez fijados los parámetros iniciales, se midieron los espectros de fluorescencia de EtBr de las disoluciones de lipoplejos. Para ello, se añadieron distintos volúmenes de una disolución formada por lipoplejos y EtBr ( $L+D+EtBr$ ) en PBS con un alto valor de  $L/D$ , sobre una disolución con idénticas concentraciones de DNA y EtBr ( $D+EtBr$ ) también en PBS. De este modo, la concentración del lípido,  $L$ , varía desde  $L/D=0$  hasta  $L/D=15$  para  $\alpha = 0,25$ ; desde  $L/D=0$  hasta  $L/D=10$  para  $\alpha = 0,5$ ; desde  $L/D=0$  hasta  $L/D=9$  para  $\alpha = 0,75$  y desde  $L/D=0,8$  hasta  $L/D=8$  para  $\alpha = 1$ . Todos los espectros fueron corregidos con los espectros de sus correspondientes blancos.

#### -Sistemas Gemini/DOPE-pDNA

Para el lipoplejo  $(C_{16}(CH_3)_2Amonio))_2C_n/DOPE-pDNA$  a  $\alpha = 0,5$ , se midió la intensidad de fluorescencia con la sonda fluorescente GelRed con una concentración de  $10000\times$ . Antes de hacer las mediciones, se prepararon  $2\text{ mL}$  de una disolución de pDNA  $1\text{ mg/mL}$  en HEPES  $40\text{ mM}$ ,  $400\text{ }\mu\text{L}$  de GelRed  $150\times$  ( $6\text{ }\mu\text{L}$  de GelRed  $10000\times$  +  $394\text{ }\mu\text{L}$  de HEPES  $40\text{ mM}$ ) y una disolución de liposomas mixtos con una concentración  $2(L/D)_\phi$ . Se prepararon  $2\text{ mL}$  de una disolución de  $pDNA:GelRed$  y  $2\text{ mL}$  de una disolución de  $Liposoma:pDNA:GelRed$ , que se fue adicionando a la cubeta de medida en donde había  $750\text{ }\mu\text{L}$  de  $pDNA:GelRed$  junto con  $750\text{ }\mu\text{L}$  de HEPES  $40\text{ mM}$ , para así mantener constantes en la cubeta las concentraciones de pDNA a  $0,25\text{ mg/mL}$  y de GelRed a  $37,5\times$ . De modo que la concentración del lípido,  $L$ , varía de  $L/D=0$  hasta  $L/D=12$ .

#### 2. Anisotropía de fluorescencia con DPH

En un vial se añadió un pequeño volumen de la disolución de  $1,91\cdot 10^{-4}\text{ M}$  de DPH en etanol, que se evaporó con la ayuda de una leve corriente de aire. Después, sobre el mismo vial se adicionaron las cantidades necesarias de lípido catiónico, previamente pesado, y el volumen de DOPE para así obtener las diferentes composiciones de CL mixto,  $\alpha$ , objeto de estudio. A continuación se disolvieron en cloroformo, y se procedió a su evaporación con la ayuda de una centrífuga y un desecador, ambos a vacío, hasta la formación de la película lipídica con la sonda DPH y sin trazas de disolvente. Se prosiguió

hidratando y homogeneizando los liposomas con DPH disuelto en ellos, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1.5., adicionando un volumen de HEPES de 5,5 mL. Durante la hidratación se homogeneizó la disolución lipídica por medio de agitación con vortex, sonicación ( $< 20 \text{ min}$ ) y calor. Tras extraer los liposomas a 100 nm se mezclaron con el pDNA siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.

Antes de comenzar la medida de la anisotropía, se procedió a fijar los parámetros espectrales de la sonda fluorescente:

- La longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) se fijó en 360 nm.
- La longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) se seleccionó a 430 nm.
- Las rendijas de excitación y emisión se asignaron a 2,5 nm para  $\rho_{eff} = 5$ ; y 5 nm para  $\rho_{eff} = 1,5$  y 2, siendo  $\rho_{eff}$  la relación de cargas efectivas existentes entre las positivas aportadas por el liposoma catiónico y las negativas aportadas por los fosfatos del DNA.

Se midió la anisotropía para el DC-Chol/DOPE en ausencia y presencia de ctDNA a distinta fracción molar de CL,  $\alpha$ , en el liposoma mixto, y a diferentes temperaturas, comprendidas entre 10 y 40 °C. Estas temperaturas se mantuvieron durante 10 min para termostatar las muestras antes de proceder a su medición. A cada temperatura y a la longitud de emisión asignada, se recogieron 36 valores de intensidad, polarizadas tanto en la excitación como en la emisión, con los polarizadores vertical-vertical ( $I_{VV}$ ) y vertical-horizontal ( $I_{VH}$ ). Gracias al programa informático incorporado al equipo, se puede convertir de forma automática estos valores de intensidad en valores de anisotropía mediante la ecuación 2.6, por lo que es necesario conocer el valor del factor  $G$  de cada disolución a las longitudes de onda de excitación y emisión fijadas. Este factor se determinó como la media de al menos 10 valores experimentales obtenidos como la relación entre las intensidades de fluorescencia polarizada en la excitación y en la emisión con los polarizadores situados horizontal-vertical ( $I_{HV}$ ) y horizontal-horizontal ( $I_{HH}$ ).

- ***Crio-Microscopía Electrónica de Transmisión (crio-TEM)***

Primeramente, se deben preparar los liposomas mixtos y a continuación se adiciona la disolución de DNA, ctDNA o pDNA, de concentraciones 0,1 mg/mL y 2 mg/mL, respectivamente, siguiendo el protocolo de preparación de disoluciones de lipoplejos, en HEPES 40 mM, descrito anteriormente. En estos lipoplejos se mantuvieron constantes las concentraciones de DNA en 0,05 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente. Las muestras se

deben preparar siguiendo el procedimiento general descrito por Dubochet et al.;<sup>16</sup> Bednar y Woodcock;<sup>17,18</sup> y Llorca et al.<sup>19</sup>

La preparación y medida con el microscopio *JEOL JEM-1230* consiste en aplicar durante 1 *min* una descarga iónica sobre la rejilla de microscopía electrónica que se encuentra cubierta por una fina capa de carbón agujereada (Agar Scientific Ltd. Reino Unido) para favorecer así la adsorción de la muestra sobre su superficie. En la rejilla se depositan 5  $\mu\text{L}$  de muestra y el exceso se elimina con un papel de filtro durante 5 *s*. La rejilla se congela en etano líquido a  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  rápidamente, manteniéndose a esta temperatura durante toda la medida, lo que significa que el portamuestras *Gatan* (*Gatan Inc.*, EE.UU) estará criogenizado. Este microscopio se configuró para trabajar a 100 *kV*, para así evitar que la radiación electrónica dañe la muestra. Las imágenes se obtuvieron con un ángulo de inclinación de  $0^{\circ}$  bajo dosis mínima.

Para el microscopio *JEOL JEM-2011*, se han utilizado rejillas de cobre perforadas *Quantifoil R1.2/1.3* (diámetro de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ) con 400 agujeros cada una. Después de dar descargas de luz a los films para hacerlos hidrofílicos, se adicionaron 2.3  $\mu\text{L}$  de muestra en los agujeros del film. Seguidamente, la rejilla fue montada en un émbolo (*Leica EM-CPC*) y secada con papel de filtro *Whatman No. 4*. La suspensión acuosa de lipoplejos, que está dentro de los agujeros, fue vitrificada inmediatamente por una rápida inmersión en etano líquido. Esta rejilla, que se encuentra bajo nitrógeno líquido, fue montada en el sistema de *crio-transferencia Gatan 626*. Las imágenes fueron obtenidas a 200 *kV* en condiciones de bajas dosis de electrones y utilizando diferentes grados de desenfoques (500-700 *nm*) para obtener un adecuado contraste de fase.<sup>20</sup>

Por último, se realizó un análisis de las micrografías obtenidas con el equipo para obtener la estructura, el tamaño, la forma y diversos parámetros característicos de cada liposoma mixto y lipoplejo formado. El aumento nominal y el escaneado de las micrografías con las que se han revelado, han sido diferentes en función del sistema estudiado.

Las imágenes obtenidas se procesaron con el programa *EMAN* con el fin de observar con mayor resolución la zona de interacción liposoma-DNA. Se obtuvieron imágenes de 2000 x 2000 *píxeles cuadrados* en las que el espesor de las membranas lipídicas se observaban con claridad. También se realizó un filtrado para eliminar el ruido de alta frecuencia, escalándose a 500 x 500 *píxeles cuadrados* y 7  $\text{\AA}/\text{píxel}$ . Los archivos se guardaron en formato de gráficos de red portátiles (PNG).



- ***Microscopía Confocal de Fluorescencia***

Se incubaron 60000 células *HEK293T* en 12 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 80%. Se prepararon los lipoplejos con el mismo protocolo de preparación que para otras técnicas, pero con 0,8  $\mu\text{g}$  de DNA por pocillo, y en DMEM con y sin suero (10% FBS), siendo la concentración de DNA en el lipoplejo, de 4  $\mu\text{g/mL}$ . Las células fueron tratadas con estos lipoplejos durante 6 horas y a continuación se incubaron durante 42 horas en presencia de un 10% de FBS con DMEM. Se utilizó como control Lipofectamina2000 con y sin FBS 10%, en las mismas condiciones que para los lipoplejos.

Tras 42 horas de incubación se retiró el medio de los pocillos y se lavaron las células con 500  $\mu\text{L}$  del tampón DPBS, reposaron durante 10 min en total oscuridad (tapado con papel de aluminio para evitar su reacción con la luz solar), y a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el medio y se adicionaron a cada pocillo otros 500  $\mu\text{L}$  de 4% p-formaldehído, dejándolos incubar durante 10 min (tapado con papel de aluminio). Después, las células fueron lavadas con DPBS 2 veces durante 10 min y con objeto de aumentar la permeabilización de la membrana, eliminar la membrana celular, permitir la entrada de la sonda PI (Propidium Iodide, 1  $\mu\text{g/mL}$ ) y la tinción de la célula, se incubaron con 500  $\mu\text{L}$  de 0,1% de Triton-X-100 durante 5 min. A continuación se lavaron las células con DPBS otras 2 veces durante 10 min en total oscuridad.

Transcurrido este tiempo, las células se incubaron durante 5 min con 1  $\mu\text{g/mL}$  de PI para teñir de manera específica el núcleo de las mismas. Pasados estos 5 min, las células se lavaron 2 veces con DPBS durante 10 min para eliminar el exceso de PI.

Finalizado todo el proceso de preparación, incubación y tinción de las células se procedió a observar, medir y digitalizar la emisión de fluorescencia en el microscopio confocal. Para ello se sacan los cubreobjetos (cubre células) de cada uno de los pocillos, se introducen en DPBS, se secan con papel, y se colocan sobre un vidrio, que se encuentra provisto de una gota de una disolución que ayuda a la inmovilización de las células, dejando que se extiendan y se cubran completamente. A continuación se adiciona un agente químico por los bordes de los cubreobjetos para que se una al cristal y no se despegue y se deja reposar durante 5 min. Una vez secado se procede a su medición con el microscopio confocal de fluorescencia.

- ***Dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS)***

Dos días antes de la formación de los lipoplejos, se preparó por pesada una disolución de DNA de 5  $\text{mg/mL}$  en PBS (para el DOEPC/DOPE) y en HEPES (para el DC-

Chol/DOPE y para los gemini de cabeza polar amonio), manteniéndola a temperatura ambiente hasta su utilización.

Los liposomas mixtos se prepararon siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.1. A continuación se adicionó a cada capilar el volumen de DNA respectivo a cada fracción molar de CL en el liposoma mixto,  $\alpha$ , y a cada relación de cargas efectivas (+)/(-),  $\rho_{eff}$ , elegida, y se añadieron los volúmenes apropiados de liposoma mixto para formar los lipoplejos correspondientes a: i)  $\alpha = 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8$  y 1 para los liposomas catiónicos de una sola cabeza polar a  $\rho_{eff} = 3, 5$  y 7; y ii)  $\alpha = 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6$  y 0,8 para los lípidos gemini de cabezas polares amonio en el rango  $1,5 < \rho_{eff} < 14$ , dependiendo del espaciador con que se trabaje. A continuación se introdujeron los capilares en la centrífuga durante 15 *min*, para que el lipoplejo sólido formado descendiera al fondo del capilar.

Por último, los capilares se cerraron a la llama, se sellaron con pegamento y se guardaron a 4 °C hasta su medición.

- ***Flow Assisted Cell Sorting ó Citometría de Flujo (FACS)***

El cultivo de células se preparó adicionando 10 % de FBS en DMEM, 7,5 % de DMSO (para mantener la estructura de las células) y células hasta obtener un total de 60000 células cultivadas. Estas células se guardaron en un baño con hielo durante media hora, se transfirieron a -80 °C durante 24 horas y se pusieron en nitrógeno líquido entre 5 y 10 *min*. Posteriormente, se realizó lo que se denomina “*thaw it*”, es decir, un descongelamiento del cultivo celular. Para ello, se introdujo el cultivo en un baño con hielo y por último se dejó a temperatura ambiente durante 5 *min*. A continuación se introdujo este cultivo 24 *horas* en el incubador a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 99 % de humedad para que las células crecieran. Pasadas estas 24 *horas* se procedió al “*Split it*”, es decir, la separación del cultivo celular en 2 o 3 cultivos nuevos para su posterior proliferación. Después de eliminar la disolución que contenía el cultivo celular, se adicionó primero 1 *mL* de DPBS y después 1 *mL* de 1x tripsina para lavar el cultivo (estas disoluciones de lavado deben ser retiradas del frasco que contiene el cultivo). Este frasco se introdujo en la incubadora durante 2 *min* hasta que las células se desprendieron de la pared, lo que significó que estaban vivas. Después del lavado se procedió a recoger las células en la disolución, y para ello se adicionaron 3 *mL* de 10 % FBS con DMEM y 1x penstrep (penicilina y estreptomicina), se recogieron con una micropipeta y se transfirieron a otros 2 o 3 botes de cultivo.

A cada frasco de cultivo se adicionó 4 *mL* de 10 % FBS con DMEM y 1x tripsina junto con 1 *mL* de la muestra de células, se removió para que se extendieran correctamente y se guardaron en la incubadora a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 99 % de humedad. Pasadas 24 *horas* se observó si los cultivos celulares estaban contaminados, es decir, si existían partículas en suspensión y si había cambiado a un color amarillento, lo que significaría que las células estarían muertas por contaminación. Si el cultivo celular no está contaminado se guarda en la incubadora otras 24 *horas*.

Transcurridas estas 48 *horas*, se introdujeron en un tubo falcon 4 *mL* de 10 % FBS con DMEM y 1x tripsina, con 1 *mL* de la disolución de células (*HEK293T* son las células de estudio, mientras que *HeLa*, *COS7*, *CHO*, *U343* y *H460* se han utilizado para hacer un estudio comparativo). De esta disolución se trasvasaron 0,8 *mL* a otro tubo falcon que contenía 9,2 *mL* de 10 % FBS con DMEM y 1x penstrep.

En una placa de 24 pocillos, se añadieron a cada uno 400  $\mu\text{L}$  de disolución de células, que se movieron para que se extendieran bien en el fondo de cada pocillo, y se guardaron en la incubadora durante 24 *horas*.

Mientras las células permanecían en la incubadora, se procedió a la preparación de los lipoplejos. Para ello, la disolución de liposomas previamente preparados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.1, se sonicó durante 2 *min*. Por otro lado, se preparó una disolución de pDNA en HEPES que permitió añadir 0,8  $\mu\text{g}$  por cada pocillo (como las muestras finales se prepararán por duplicado, hay que añadir 1,6  $\mu\text{g}$  para cada  $\alpha$  y cada  $\rho_{eff}$  estudiados, con una concentración final de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En diferentes eppendorf se adicionó 2,1  $\mu\text{L}$  de disolución de pDNA, 98  $\mu\text{L}$  de DMEM, 2  $\mu\text{L}$  de disolución de liposomas mixtos y otros 98  $\mu\text{L}$  de DMEM hasta alcanzar un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ . Para que se formaran los lipoplejos se esperó 30 *min*. Pasado este tiempo, se adicionaron otros 200  $\mu\text{L}$  de DMEM a las células con lipoplejos a las que se realizó un estudio sin serum (sin FBS), 160  $\mu\text{L}$  de DMEM con 40  $\mu\text{L}$  de FBS a las que se hizo un estudio con serum, (para conseguir 10 % FBS en DMEM en 400  $\mu\text{L}$  de disolución total).

Pasadas 24 *horas* se cogió la placa de la incubadora, se eliminó el medio y se procedió a realizar un lavado adicionando 100  $\mu\text{L}$  de DMEM. Se eliminó este medio y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de lipoplejos a cada uno de los pocillos, y se guardaron en la incubadora. Transcurridas 6 *horas* se eliminó la disolución de cada pocillo, excepto la de los controles, y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de DMEM para lavar las células. Se eliminó el medio y se adicionó a cada pocillo 500  $\mu\text{L}$  de 10 % FBS con DMEM y 1x penstrep. Antes de medir FACS de estos cultivos celulares con lipoplejos, se introdujo la placa en la

incubadora (no se deben sobrepasar 42-48 *horas* para evitar que se reduzca el % GFP y la intensidad de emisión). Pasado este tiempo, se sacó la placa de la incubadora, se eliminó el medio de cada pocillo y se procedió a su lavado adicionando 100  $\mu\text{L}$  de DPBS y 100  $\mu\text{L}$  de 1x tripsina, eliminando siempre el medio entre uno y otro. A continuación se introdujo la placa en la incubadora 1 *min*, y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de 0,2 % de FBS en DPBS en cada pocillo. La disolución de células con lipoplejos se recogió en un eppendorf de autoclave, y se introdujeron en hielo hasta que se midió FACS.

Para que la medida fuese correcta, se optimizaron los parámetros de medida hasta conseguir la máxima intensidad de emisión de cada población celular. Finalmente se procedió a obtener los resultados y gráficas con el *software WinMD12.8*.

Como control se utilizó la *Lipofectamina2000*, utilizado comúnmente por todos los grupos de investigación. Al hacerse también por duplicado, se adicionaron 4  $\mu\text{L}$  de Lipofectamina2000 para 1,6  $\mu\text{g}$  de pDNA. En un eppendorf se preparó la disolución de Lipofectamina2000 (4  $\mu\text{L}$ ) en DMEM (100  $\mu\text{L}$ ). En otro eppendorf se preparó la disolución de pDNA 0,1  $\text{mg/mL}$  y para ello se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  de la disolución de pDNA con 100  $\mu\text{L}$  de DMEM. Transcurridos 5 *min* a temperatura ambiente, se mezclaron ambas muestras en un solo eppendorf y se adicionaron a la placa en 2 pocillos como control.

- ***Viabilidad celular/Citotoxicidad (Ensayo MTT)***

La preparación de las células se realizó de la misma manera que para las técnicas de FACS y microscopía confocal de fluorescencia. La diferencia que presenta esta técnica de reducción de MTT con las otras dos, es que sólo se requirió 0,2  $\mu\text{g}$  de pDNA por pocillo ([pDNA] = 1  $\mu\text{g/mL}$ , en cada pocillo). El volumen de lipoplejo que se adicionó a cada pocillo fue de 200  $\mu\text{L}$ . Los cultivos celulares se prepararon en microplacas de 96 pocillos, los cuáles se dejaron incubando durante 24 *horas*.

Para la preparación de los lipoplejos se adicionó: 0,6  $\mu\text{g}$  de pDNA, 0,75  $\mu\text{L}$  de liposoma mixto, y 300  $\mu\text{L}$  de DMEM, y se dejaron reposar durante 30 *min*. Transcurrido este tiempo, se adicionaron otros 300  $\mu\text{L}$  de 20 % de FBS con DMEM hasta alcanzar un volumen de 600  $\mu\text{L}$  de lipoplejos en 10 % de FBS.

La microplaca de 96 pocillos con células y lipoplejos se incubó a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 99 % de humedad durante 6 *horas*. Luego se eliminó el medio y se procedió a su lavado con DPBS y 1x Tripsina, de la misma manera que con las técnicas de FACS y CFM. A continuación se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de 10 % de FBS con DMEM y se incubaron durante 42 *horas* antes de adicionar 20  $\mu\text{L}$  de 4 % MTT en DPBS (5  $\text{mg/mL}$ ) sobre la disolución

celular sin eliminar el medio anterior en el que se encontraban las células. Una vez adicionado el MTT se incubó durante 4 *horas* en oscuridad puesto que es sensible a la luz. Después de eliminar el medio de los 96 pocillos se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO puro, lo que provoca un cambio en la coloración, de azul a morado, debido a que el MTT que estaba reducido como formazan se disolvió. Se guarda durante 5 *min* a temperatura ambiente antes de su medición con el *software Microplate Analyst del MTT BIO-RAD modelo 680*. Es importante tener en cuenta que cuando el MTT se encuentra en su forma reducida, es decir, como formazan, la intensidad que se obtiene es máxima en el interior de las células vivas. Sin embargo, si la coloración es amarilla implica que el formazan no se ha reducido en el medio mitocondrial y las células están muertas, siendo su intensidad mínima.

Se realiza un estudio en función del tiempo de incubación (6, 24 y 48 *horas*). Con los valores de intensidad se calcula el % de viabilidad celular de cada lipoplejo utilizando la ecuación 2.15. Por último se procedió a realizar la gráfica del % de viabilidad celular en función del tiempo con la ayuda del *software GrafPad Prism*.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Dupont, J.; Consorti, C. S.; Suarez, P. A. Z.; de Souza, R. F. *Org. Synth.* **2002**, 79, 236.
- (2) Valiente, M.; Rodenas, E. *Colloid Polym. Sci.* **1993**, 271, 494.
- (3) Pozharski, E.; MacDonald, R. C. *Biophys. J.* **2003**, 85, 3969.
- (4) Mel'nikov, S. M.; Lindman, B. *Langmuir* **1999**, 15, 1923.
- (5) Barreleiro, P. C. A.; Lindman, B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 6208.
- (6) Hirsch-Lerner, D.; Zhang, M.; Eliyahu, H.; Ferrari, M. E.; Wheeler, C. J.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1714, 71.
- (7) Zuidam, N. J.; Hirsch-Lerner, D.; Margulies, S.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1419, 207.
- (8) Gonçalves, E.; Debs, R. J.; Heath, T. D. *Biophys. J.* **2004**, 86, 1554.
- (9) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Acad./Plenum: New York, **1999**.
- (10) Hirsch-Lerner, D.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1370, 17.
- (11) Infelta, P.; Grätzel, M. *J. Chem. Phys.* **1979**, 70, 179.
- (12) Turro, N. J.; Lee, P. C. C. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 3367.
- (13) Segovia, M. J.; Martinez, F.; Alvarez, J. M. *Colloids Surf. A* **1996**, 106, 1.
- (14) Rodriguez, A.; Junquera, E.; del Burgo, P.; Aicart, E. J. *Colloid Interface Sci.* **2004**, 269, 476.
- (15) Eastman, S. J.; Siegel, C.; Tousignant, J.; Smith, A. E.; Cheng, S. H.; Scheule, R. K. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1325, 41.
- (16) Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. Q. *Rev. Biophys.* **1988**, 21, 129.
- (17) Bednar, J., V. M.; Studitsky, S. A.; Grigoryev, G.; Felsenfeld; Woodcock, C. L. *Mol Cell* **1999**, 4, 377.
- (18) Bednar, J.; Woodcock, C. L. *Methods Enzymol* **1999**, 304, 191.
- (19) Llorca, O.; McCormack, E.; Hynes, G.; Grantham, J.; Cordell, J.; Carrascosa, J. L.; Willison, K. R.; Fernández, J. J.; Valpuesta, J. M. *Nature* **1999**, 402, 693.
- (20) Dubochet, J. *Methods Cell Biol.* **2007**, 79, 7.